



**Ângela Maria Martins
Vieira da Cunha**

**Desenvolvimento de filmes de quitosana com
atividade antioxidante**



**Ângela Maria Martins
Vieira da Cunha**

**Desenvolvimento de filmes de quitosana com
atividade antioxidante**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Pós-doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Projeto cofinanciado pela União Europeia e pelo Feder através do programa QREN.

Trabalho enquadrado no projeto WineSulFree – Avaliação de tecnologias que permitam a redução do teor de sulfitos dos vinhos (Referência BI/UI51/4623/2009) e no trabalho de pós-doutoramento SFRH/BPD/46584/2008

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Inês Purcell Portugal Branco
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Professora Doutora Maria Manuela Estevez Pintado
Professora auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientador

Professor Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Co-orientador

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Pós-doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores Prof. José António Lopes da Silva, e à Doutora Cláudia Nunes.

A todos os colegas do laboratório, do projeto WineSulFree e ao Prof. Manuel António Coimbra.

Aos meus familiares, à minha mãe e aos meus irmãos.

Ao Pedro e aos meus amigos.

A todos, muito obrigada pelo suporte para a realização deste trabalho.

“Life is like riding a bicycle. To
keep your balance you must
keep moving on”

Albert Einstein

palavras-chave

Quitosana, filmes, genipina, solubilidade, atividade antioxidante, vinho

resumo

Os filmes obtidos a partir de polímeros naturais e renováveis têm criado grande interesse na indústria alimentar. A quitosana é um polímero, com propriedades funcionais importantes na área alimentar, tais como biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e antioxidante, não-toxicidade, e a capacidade de formar filmes. No entanto, os filmes de quitosana apresentam alta solubilidade em soluções aquosas ácidas.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes de quitosana com atividade antioxidante e insolúveis em meio ácido para posterior aplicação no processo de vinificação como conservante.

Foram preparados filmes de quitosana por evaporação de solvente e reticulados com genipina para os tornar insolúveis em soluções hidroalcoólicas ácidas. No desenvolvimento dos filmes diferentes parâmetros foram otimizados: o tipo de quitosana (alta, média e baixa viscosidade), a concentração de genipina (0,05-0,1%), o tempo de reação entre a quitosana e a genipina (2, 4, 6, 8, 12 e 24 h) e o tipo e concentração de plastificante (glicerol ou sorbitol, 0,75-2% (m/v)). Com o intuito de melhorar a atividade antioxidante do filme de quitosana com genipina foi testada a incorporação de um extrato de *Aloe vera* ou oligoquitosanas.

Os filmes de quitosana-genipina apresentaram menor solubilidade em soluções ácidas quando comparados com os filmes de quitosana. Foi observado que os filmes com quitosana de média viscosidade apresentaram o menor valor de solubilidade (13 %). O aumento da concentração de genipina na gama estudada não diminuiu a solubilidade do filme em meio ácido. Enquanto que o aumento de tempo de reação de 2 para 24 h entre o agente reticulante e a quitosana diminui a solubilidades dos filmes em 38 %.

Os filmes de quitosana-genipina em que foi incorporado um extrato de *Aloe vera* ou oligoquitosanas obtiveram uma atividade antioxidante superior à dos filmes preparados apenas com quitosana. No entanto, a solubilidade de ambos os filmes aumentou significativamente.

No estudo do efeito do plastificante verificou-se que com o aumento da quantidade de glicerol de 0,75 para 1,5 % a atividade antioxidante do filme aumentou 57 %, enquanto que não foram observadas diferenças significativas para concentrações superiores. Observou-se uma ligeira diminuição na solubilidade com o aumento da quantidade de glicerol. Pelo contrário, aumentando a quantidade de sorbitol de 0,75 para 1,5 % a atividade antioxidante do filme diminuiu e a solubilidade aumentou.

Em resumo, considerando que o filme pretendido deveria possuir baixa solubilidade em meio ácido aquoso e maior atividade antioxidante, as melhores condições foram a quitosana de média viscosidade com genipina 0,05 % durante 24 h de reação e adição de glicerol 1,5 %. Estes filmes revelaram características interessantes para a aplicação em vinho, ou seja, maior atividade antioxidante 93 % ao fim de 46 h e menor solubilidade, 6 % ao fim de 7 dias.

Os filmes de quitosana-genipina foram testados para a conservação do vinho. Este vinho demonstrou estabilidade microbiológica ao fim de 8 meses, não havendo crescimento de leveduras nem de bactérias. A sua atividade antioxidante diminuiu para o vinho tinto e aumentou para o vinho branco em relação ao vinho com adição de anidrido sulfuroso (SO₂). A análise sensorial revelou que o vinho tinto com filme obteve uma classificação global (sabor, aroma e cor) inferior ao vinho com SO₂, enquanto que o vinho branco com filme obteve a melhor classificação. O vinho branco sem adição de SO₂ é beneficiado com a adição do filme de quitosana, demonstrando que esta metodologia tem potencial para ser aplicada durante a vinificação em substituição do SO₂.

keywords

Chitosan, biopolymer films, genipin, solubility, antioxidant activity, wine

abstract

Films obtained from natural and renewable polymers have attracted great interest in food industry. Chitosan is one of such polymers and has shown attractive functional properties in the agro-food area such as biocompatibility, antimicrobial, non-toxicity, antioxidant, and great ability to form films. However, chitosan films typically show high solubility in aqueous acid solutions.

The main goal of this work was to develop a chitosan-based films insoluble in acid medium and with improved antioxidant activity in order to apply in the vinification process as a wine preservative.

Chitosan films were prepared by solvent casting and crosslinked using *genipin* to render them insoluble in aqueous acid solutions. In order to optimize the methodology, different parameters were studied: type of chitosan (high, medium, and low viscosity), *genipin* concentration (0.05-0.1%), crosslinking time (2, 4, 6, 8, 12 and 24 h), and type (glycerol or sorbitol) and concentration (0.75-2 % (w/v)) of plasticizer. *Aloe vera* extract or oligochitosans were incorporated into chitosan films to improve their antioxidant activity.

The chitosan-*genipin* films showed lower solubilities in acid solutions when compared to the pristine chitosan films used as reference. The lowest solubility (13 %) was observed for the chitosan-*genipin* films prepared with medium viscosity chitosan. The increase of *genipin* concentration in the range studied did not significantly improve the insolubility of the film in acid medium. While the increase of reaction time between chitosan and *genipin* from 2 to 24h decrease the film solubility in 38 %.

The chitosan-*genipin* films with *Aloe vera* extract or oligochitosan showed an increase in the antioxidant activity. However, the solubility of both films also increased compared with the pristine films.

In the study of the plasticizer effect, the antioxidant activity increased 57 % with the increase of the amount of glycerol from 0.75 to 1.5 %, while no significant differences were observed with further increase to 2 %. A slight decrease on film solubility was observed with the raise of the glycerol amount, mainly in acidic medium. On the contrary, the increase of the sorbitol amount from 0.75 to 1.5 % decreases the antioxidant activity and increases the film solubility.

Chitosan films crosslinked with *genipin* and plasticized with glycerol were found to have more attractive characteristics to wine preservation, i.e. higher antioxidant activity and lower solubility.

In conclusion, considering that the desired film should have low solubility in aqueous acidic medium and higher antioxidant activity, the medium viscosity chitosan with 0.05 % *genipin* with a crosslinking time of 24 h and 1.5 % glycerol. These films revealed interesting features for application in wine, ie higher antioxidant activity 93 % and lower solubility 6 %.

The application of chitosan-*genipin* films were tested for preservation of the wine. This wine showed microbiological stability after 8 months of storage, with no growth of yeast or bacteria for both wines. The antioxidant activity decreased for the red wine but increased for the white wine in comparison to the samples with sulphur dioxide (SO₂). Sensorial analysis revealed that red wines treated with chitosan film showed a lower global evaluation (taste, aroma, and colour) than the wines treated with SO₂, while the white wines had the best evaluation among all.

The chitosan film seems to work better for white wine without addition of SO₂. This methodology has the potential to be applied for the replacement of SO₂ during winemaking.



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

FRAP – Ensaio do poder antioxidante de redução do ião ferro

GA – Grau de acetilação

GC-FID – Cromatografia em fase gasosa – detetor por ionização de chama

GlcN – D-glucosamina

GlcNac – N-acetil-D-glucosamina

GP – Grau de polimerização

Gro – Glicerol

HS-SPME – Micro extração em fase sólida do espaço de cabeça

M_M – Massa molecular

OQs – oligoquitosanas

Q – Filme de quitosana

Q+G – Filme de quitosana com genipina

Q+G+Gro – Filme de quitosana com genipina e glicerol

Q+G+Gro+A – Filme de quitosana com genipina, glicerol e *Aloe vera*

Q+G+Gro+OQs – Filme de quitosana com genipina, glicerol e oligoquitosanas

Q+G+Sor – Filme de quitosana com genipina e sorbitol

TPTZ – 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina



ÍNDICE

Júri

Agradecimentos

Resumo

Abstract

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	i
ÍNDICE	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Quitina, quitosana e oligoquitosanas	1
1.1.1 – Estrutura e propriedades químicas	1
1.1.2 – Propriedades biológicas	2
1.2 – Modificações químicas da quitosana	6
1.2.1 Reticulação da quitosana	7
1.2.1.1 – Genipina	8
1.3 – Aplicações da quitosana	12
1.3.1 – Potencialidades da quitosana como filmes/revestimentos	12
1.3.1.1 – Efeito do plastificante	13
1.3.1.2 – Propriedades Mecânicas	15
1.4 – Métodos para determinar atividade antioxidante	17
ABTS	18
FRAP	19
DPPH	19
2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO	21
2.1 – Sulfitos no vinho	21
2.2 – Objetivos do trabalho	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 – Origem dos materiais	25
3.2 – Determinação do grau de acetilação da quitosana	25
3.3 – Preparação de filmes de quitosana	26
3.3.1 – Preparação de filmes de quitosana com um agente reticulante, a genipina	26
3.3.2 – Preparação de filmes de quitosana com genipina e incorporação de <i>Aloe vera</i> ou oligoquitosanas	27
3.4 – Caracterização dos filmes	27
3.4.1 – Humidade	27
3.4.2 – Solubilidade dos filmes em água e solução modelo de vinho	28
3.4.3 – Determinação da atividade antioxidante dos filmes	28



3.4.3.1 – ABTS	28
3.4.3.2 – DPPH.....	29
3.4.3.3 – FRAP	30
3.4.4 – Determinação das propriedades mecânicas	30
3.4.5 – Determinação do ângulo de contacto.....	31
3.5 – Análise dos vinhos ao longo do tempo.....	32
3.5.1 – Atividade Antioxidante.....	32
3.5.2 – Compostos fenólicos totais	32
3.5.3 – Taninos totais	33
3.5.4 – Medição da cor.....	33
3.5.5 – Análise microbiológica	35
3.5.6 – Análise Sensorial	35
3.6 – Análise Estatística.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 – Otimização da preparação de filmes de quitosana	37
4.1.1 – Efeito da massa molecular da quitosana.....	37
4.1.2 – Efeito da concentração de genipina.....	40
4.1.3 – Tempo de reação da quitosana com a genipina.....	41
4.1.4 – Quitosanas da Sigma e Fluka.....	44
4.2 – Preparação de filmes de quitosana com genipina e incorporação de <i>Aloe vera</i> ou oligoquitosanas	45
4.2.1 – Filmes de quitosana com genipina e incorporação de <i>Aloe vera</i>	46
4.2.2 – Filmes de quitosana e genipina e incorporação de oligoquitosanas.....	48
4.3 – Estudo do efeito do plastificante	50
4.4 – Caracterização dos filmes selecionados	54
4.4.1 – Atividade Antioxidante.....	54
4.4.2 – Solubilidade.....	56
4.4.3 – Propriedades mecânicas	57
4.4.4 – Ângulo de contacto	59
4.5 – Aplicação dos filmes de quitosana com genipina na conservação do vinho.....	60
4.5.1 – Atividade antioxidante	61
4.5.2 – Compostos fenólicos totais	62
4.5.3 – Taninos totais	64
4.5.4 – Cor	65
4.5.5 – Análise microbiológica	67
4.5.6 – Análise sensorial.....	68
5. CONCLUSÃO	73
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de publicações científicas relacionadas com a quitina e a quitosana de 2000 a 2011 (Fonte: Web of Knowledge) ^[8]	2
Tabela 2 – Relação entre as propriedades biológicas da quitosana e as suas características ^[8]	3
Tabela 3 – Atividade antioxidante da quitosana (Q_{SMV}), <i>Aloe vera</i> (A) e oligoquitosanas (OQs) por diferentes métodos espectrométricos, ABTS e FRAP.	45
Tabela 4 – Propriedades mecânicas obtidas de curvas de tensão – deformação para os filmes de quitosana com genipina e diferentes proporções de glicerol.	58
Tabela 5 - Ângulo de contacto (usando água como solvente) da superfície dos filmes de quitosana com genipina e diferentes proporções de glicerol.	59
Tabela 6 – Unidades formadoras de colónias (UFC/mL) nas amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento dos filmes de quitosana (Q) ao longo do armazenamento.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da (a) quitina e da (b) quitosana (adaptado de Fernandes <i>et al.</i> ^[1]).....	1
Figura 2 – Derivados e aplicações de quitosana (adaptado de Tharanathan e Kittur ^[27]).....	6
Figura 3 – Estrutura de um hidrogel de quitosana formado por polímero de quitosana com agente reticulante: —, quitosana; —•—, agente reticulante, +, carga positiva da quitosana (adaptado de Berger <i>et al.</i> ^[26]).	7
Figura 4 – Estrutura química da genipina (adaptado de Wang <i>et al.</i> ^[36]).....	8
Figura 5 – Reações de ligação da genipina à quitosana pelo mecanismo 1 (adaptado de Butler <i>et al.</i> ; Chen <i>et al.</i> ; Muzzarelli ^[28, 32, 38]).	9
Figura 6 – Mecanismo 2 da genipina com a quitosana (adaptado de Chen <i>et al.</i> ^[38]).	10
Figura 7 – Mecanismo 3 da genipina com a quitosana (adaptado de Mi <i>et al.</i> ^[39]).	11
Figura 8 – Exemplo de uma curva de tensão/deformação até à rutura (adaptado de Beer and Johnston ^[54]).	15
Figura 9 – Representação esquemática do comportamento tensão-deformação para materiais frágeis e dúcteis quando sujeitos a uma tensão uniaxial extensional até ao ponto de rutura (adaptado de Beer and Johnston ^[54]).	17
Figura 10 – Formação do catião radical ABTS ^{•+} (adaptado de Huang <i>et al.</i> ^[58]).....	18
Figura 11 – Redução do Fe(III) para Fe(II) do método FRAP. (adaptado de Huang <i>et al.</i> ^[58]).....	19
Figura 12 – Reação do método de DPPH. (adaptado de Huang <i>et al.</i> ^[58]).....	20
Figura 13 – Esquema do ângulo de contacto para uma gota de água molhante sobre a superfície do filme.	31



Figura 14 – Desenho esquemático representativo do Sistema CIELab.	34
Figura 15 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de (a) quitosana (1,5 %) e (b) quitosana com genipina (0,05 %) de alta, média e baixa viscosidade. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	38
Figura 16 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q; 1,5 %) e quitosana com genipina (Q+G; 0,05 %) de alta (Q_{FAV}), média (Q_{FMV}) e baixa (Q_{FBV}) viscosidade numa matriz modelo de vinho ao fim de 15 dias. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	39
Figura 17 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes concentrações (0,05 e 0,1 %) de genipina (Q+G). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	40
Figura 18 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q; 1,5 %) de média viscosidade com diferentes concentrações (0,05 e 0,1 %) de genipina (Q+G) na (a) matriz modelo de vinho e em (b) água ao fim de 15 dias. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	41
Figura 19 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes tempos de reação de genipina (Q+G). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	42
Figura 20 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes tempos de reação de genipina (Q+G) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água ao fim de 7 dias. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	43
Figura 21 – Percentagens de perda de massa na (a) matriz modelo de vinho e (b) água ao fim de 15 dias para quitosana de média viscosidade da Fluka e da Sigma com 24 h de tempo de reação. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	44
Figura 22 – Atividade antioxidante ao longo do tempo pelo método ABTS dos filmes de quitosana (Q) com genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de <i>Aloe vera</i> (A). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	46
Figura 23 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) com genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de <i>Aloe vera</i> (A) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água durante 15 dias. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	47
Figura 24 – Atividade antioxidante ao longo do tempo pelo método ABTS dos filmes de quitosana (Q) com adição de genipina (G) e incorporação de um extrato de oligoquitosanas (OQs). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	48
Figura 25 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) com adição de genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de oligoquitosanas (OQs) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água durante 7 dias. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	50
Figura 26 – Atividade antioxidante ao longo do tempo dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	51



Figura 27 – Atividade antioxidante ao longo do tempo dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de sorbitol (Sor). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	52
Figura 28 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) e sorbitol (Sor) durante 7 dias numa solução modelo de vinho. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	53
Figura 29 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) e sorbitol (Sor) durante 7 dias em água. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	53
Figura 30 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana com genipina (Q+G), pelo método de radicais livres (a) ABTS e (b) DPPH. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	55
Figura 31 – Atividade antioxidante de filmes de quitosana (Q) e quitosana com adição de genipina (Q+G) pelo método do FRAP ao fim de 60 minutos. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	55
Figura 32 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana com genipina (Q+G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) durante 7 dias na (a) matriz modelo de vinho e em (b) água. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	57
Figura 33 – Curvas de tensão em função da deformação, correspondentes a filmes de quitosana com genipina (Q+G), quitosana com genipina e glicerol (Q+G+Gro) 0,75 % e 1,5 %.	57
Figura 34 – Atividade antioxidante das amostras de (a) vinho tinto (T) e (b) branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q) ao longo do tempo. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	62
Figura 35 – Compostos fenólicos totais das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q) ao longo do armazenamento. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	63
Figura 36 – Valores de taninos totais das amostras de vinho tinto (T) sem adição de SO_2 (0), com adição de SO_2 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (A). (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	64
Figura 37 – Valores de (a) intensidade e (b) tonalidade das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de SO_2 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (A), ao longo do armazenamento. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>)... ..	66
Figura 38 – Valores do L^* , a^* e b^* das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de SO_2 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q), ao longo do armazenamento. (<i>letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$</i>).	67
Figura 39 – (a) Principais descritores de cor, aroma e gosto para o vinho tinto e (b) avaliação global da cor, aroma e gosto.....	70



Figura 40 – (a) Principais descritores de cor, aroma e gosto para o vinho branco e (b) avaliação global da cor, aroma e gosto.	71
---	----

1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo deste trabalho foi a preparação e caracterização de filmes de quitosana que apresentassem propriedades antioxidantes e integridade satisfatória quando em meio aquoso ácido. Neste contexto, abordam-se de seguida alguns aspetos importantes do conhecimento atual relacionados, principalmente, com (a) as características químicas, estruturais e biológicas da quitosana, (b) possíveis estratégias de reticulação da quitosana, (c) as suas propriedades de formação de filmes e, por fim, (d) uma breve referência às técnicas disponíveis para avaliação da atividade antioxidante.

1.1 – Quitina, quitosana e oligoquitosanas

Os polissacarídeos são utilizados em diversas aplicações devido às suas propriedades, nomeadamente, o seu carácter renovável, reciclável e biodegradável. A quitina e a celulose são os polissacarídeos naturais mais abundantes e têm sido amplamente explorados para várias aplicações ^[1].

1.1.1 – Estrutura e propriedades químicas

A quitina é um polissacarídeo constituído por uma longa cadeia linear de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (figura 1). A quitina é facilmente obtida a partir da parede celular dos fungos e do exosqueleto dos artrópodes, como crustáceos (caranguejos, lagostas e camarões) ^[2-6].

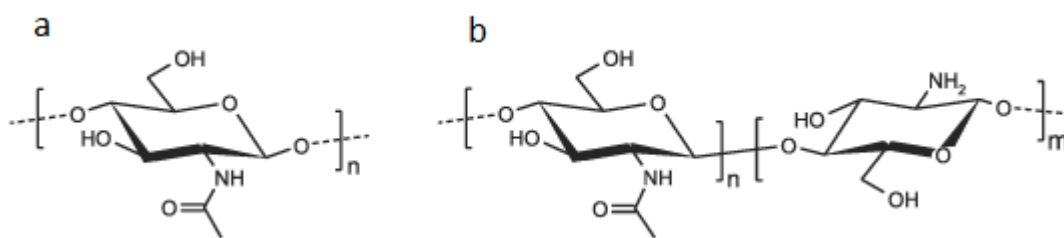


Figura 1 – Estrutura química da (a) quitina e da (b) quitosana (adaptado de Fernandes *et al.* ^[1]).

A quitosana (figura 1) é obtida por desacetilação parcial da quitina, sendo portanto, um polímero de longa cadeia linear composto por monómeros de 2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcN) e de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (GlcNAc) unidos por ligações covalentes



β -1,4. A distinção entre a quitina e a quitosana é baseada no grau de acetilação (GA), considerando-se que a quitosana corresponde ao polissacarídeo com GA inferior a 50 % ^[1, 5]. Os oligossacarídeos da quitosana (oligoquitosanas, OQ_s) são cadeias de quitosana com baixos graus de polimerização (GP < 20) ^[7].

Existem muitos estudos realizados sobre a quitina e a quitosana, no entanto, é superior o número de trabalhos publicados sobre a quitosana (tabela 1), provavelmente porque, para além das suas propriedades atrativas para aplicação em diversas áreas, a insolubilidade da quitina na maioria dos solventes levanta algumas limitações para a sua aplicação, o mesmo não acontecendo com a quitosana que apesar de ser insolúvel em água, a presença dos grupos amina ionizáveis torna este polissacarídeo solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas (pH < 6).

Tabela 1 – Número de publicações científicas relacionadas com a quitina e a quitosana de 2000 a 2011 (Fonte: Web of Knowledge) ^[8].

Pesquisa	Artigos de revisão	Artigos científicos	Patentes
Quitina	329	17 455	9 064
Quitosana	647	47 188	20 041
Quitosana e quitina	196	7 884	11 804

1.1.2 – Propriedades biológicas

A quitosana e as oligoquitosanas apresentam diversas propriedades biológicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, hemostáticas, analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, anti-colesterolémicas, antitumorais e imunoestimuladoras. Por isso, têm atraído interesse científico e industrial em áreas como biotecnologia, farmacêutica, biomedicina, cosméticos e indústria alimentar, entre outros ^[4-6, 9].

O mecanismo responsável pelas propriedades biológicas da quitosana ainda não é bem conhecido, mas pensa-se que está relacionado, principalmente, com o facto da quitosana ser um polieletrólito catiónico que, quando dissolvido, possui carga positiva nos grupos amina ($-\text{NH}_3^+$). Este facto permite que este polissacarídeo catiónico tenha grande afinidade para superfícies carregadas negativamente, tendência para agregar com compostos polianiónicos e apresente elevado efeito quelante para os iões metálicos ^[5].



O GA e a massa molecular (M_M) da quitosana têm o papel predominante em algumas das suas propriedades (tabela 2), podendo estes parâmetros variar com a origem e as condições utilizadas durante a obtenção da quitosana ^[8].

Para as oligoquitosanas, tal como acontece para a quitosana, o M_M e o GA, têm uma grande influência nas suas propriedades biológicas ^[7]. No entanto, ao contrário do que acontece com a quitosana de M_M elevada, as oligoquitosanas são facilmente absorvidas pelo intestino, entram na corrente sanguínea e podem manifestar o efeito biológico no organismo ^[9].

Tabela 2 – Relação entre as propriedades biológicas da quitosana e as suas características^[8].

Propriedades	Características relevantes
Biodegradabilidade	GA, distribuição dos grupos acetilo, M_M
Biocompatibilidade	GA
Hemostática	GA, M_M
Analgésica	GA
Antimicrobiana	GA
Anti-colesterolémica	GA, M_M , viscosidade
Antioxidante	GA, M_M

A quitosana apresenta elevada **biocompatibilidade** e **biodegradabilidade**. Estas propriedades dependem das características da amostra (fonte de onde foi extraída, o método de obtenção, GA e M_M). Embora esteja ausente nos mamíferos, a quitosana pode ser degradada *in vivo* por várias enzimas proteolíticas, como a lisozima, a papaína e a pepsina. A sua biodegradação leva à liberação de oligoquitosanas de comprimento variável ^[8].

A quitosana e as oligoquitosanas apresentam **atividade hemostática** (anticoagulante) testada *in vitro* e *in vivo*. O mecanismo ainda não é bem conhecido, no entanto, a atividade anticoagulante da quitosana parece estar relacionada com a carga positiva deste polissacarídeo ^[8, 10].

Para o **efeito analgésico** da quitosana, o mecanismo sugerido centra-se na remoção de prótons da área inflamada. Devido à sua natureza policatiónica, os grupos amina primários livres da quitosana podem protonar na presença de prótons, sendo o aumento do pH o principal responsável do efeito analgésico ^[8, 11].



Há vários mecanismos propostos para as propriedades **anti-colesterolémicas** da quitosana. A redução de absorção de gordura e colesterol numa dieta pode acontecer pelo seu aprisionamento nas soluções viscosas de polissacarídeos. Por outro lado, a presença do grupo amina na sua estrutura determina a existência de uma interação eletrostática entre a quitosana e aniões, tais como ácidos gordos e ácidos biliares ao nível do aparelho digestivo ^[8, 12]. Ogawa *et al.* ^[13] propôs outro mecanismo que aponta para a adsorção da quitosana à superfície da emulsão lipídica, formando uma camada protetora de quitosana que impede as lípases de se ligarem à superfície das micelas e de aceder ao seu interior.

A atividade **antitumoral** da quitosana foi demonstrada devido à sua capacidade para inibir o crescimento de células tumorais, principalmente, devido ao seu efeito **imunoestimulador** ^[14]. O mecanismo sugerido envolve a estimulação de linfócitos T citotóxicos e/ou aumento da produção de linfocinas por ativação dos linfócitos. Um outro estudo do efeito da quitosana no crescimento de tumores e metástases revelou que a ativação de macrófagos pela quitosana tem efeitos antitumorais. No entanto, este mesmo estudo alerta para os efeitos nocivos da quitosana, no que diz respeito à indução das propriedades angiogénicas, como a promoção do crescimento do tumor e a sua invasão ^[8].

A atividade **antimicrobiana** depende do tipo de quitosana, GA, M_M, microrganismo alvo, pH do meio e da presença de outros aditivos ou componentes dos alimentos. No entanto, para muitos autores, o principal responsável da atividade antimicrobiana da quitosana é o número efetivo de grupos -NH_3^+ ^[15, 16]. Foram efetuados estudos sobre a atividade antimicrobiana da quitosana em diferentes grupos de microrganismos e foram sugeridos três mecanismos principais como causa da inibição do crescimento de bactérias. A interação dos grupos amina com carga positiva com os grupos aniónicos na superfície de bactérias Gram-negativas provoca a formação de uma camada impermeável em torno da célula, impedindo o transporte de solutos essenciais para o seu interior. O efeito de impermeabilização foi observado em condições ligeiramente ácidas, nas quais a quitosana está protonada, podendo ser reversível se houver um aumento do pH ^[8, 17]. Outro mecanismo proposto revela o poder da quitosana em inibir o crescimento microbiano



atuando como agente quelante de metais, oligoelementos ou nutrientes essenciais para o organismo e que por isso ficam indisponíveis, impedindo o crescimento do microrganismo. O terceiro mecanismo envolve a inibição da síntese de RNA e de proteínas por permeação para o núcleo da célula, causando perturbações que levam à morte celular^[8, 15]. A quitosana também é capaz de interagir com as proteínas e provocar a sua floculação, sendo esta ação altamente dependente do pH^[8, 18].

Vinsova e Vavrikova^[19] consideraram a quitosana de baixa M_M e parcialmente acetilada como um **antioxidante** natural. De facto a quitosana tem demonstrado grande atividade antioxidante radicalar, sendo os resultados obtidos para os oligossacarídeos comparáveis aos obtidos com antioxidantes comerciais, e.g. trolox^[8, 20]. Os radicais livres estão associados a espécies reativas de oxigénio (ROS) que causam o envelhecimento e a morte celular. Estas espécies são produzidas pelo metabolismo das células e, normalmente, são reduzidos envolvendo vários sistemas antioxidantes. Substâncias antioxidantes e/ou anti-radicalares reduzem os ROS, antes de estes reagirem com outros grupos na célula, protegendo-a^[21, 22]. Os antioxidantes podem inibir as reações radicalares em cadeia por eliminação direta das ROS e/ou por quelação de iões metálicos como o Fe^{3+} ou o Cu^+ . O efeito quelante de iões metálicos é uma das razões pelas quais a quitosana pode ser considerada como um potencial antioxidante natural para estabilizar alimentos e para prolongar o seu tempo de vida de prateleira^[23]. Estudos efetuados com quitosana revelaram que a sua atividade antioxidante depende quer do GA quer da M_M do polissacarídeo. Quanto ao efeito do GA verificou-se em que quanto menor o GA maior a sua atividade antioxidante^[8]. Num estudo com quitosanas de diferentes tamanhos, em sumo de maçã, a quitosana de baixa M_M apresentou um efeito mais forte na eliminação de radicais e uma maior capacidade para complexar catiões metálicos (Fe^{3+}), relativamente a quitosanas de maior M_M ^[24]. Outro trabalho em que se estudou a atividade antioxidante de 5 polissacarídeos diferentes com base na capacidade de reduzir os radicais de DPPH, ABTS e o poder de redução do metal Cu^{2+} , demonstrou que a quitosana de baixa M_M , tem maior capacidade de reduzir os radicais em estudo, enquanto a quitosana de alta M_M é menos eficaz^[25]. O mecanismo da atividade antioxidante da quitosana ainda é pouco conhecido, embora se assuma que o grupo amina e os grupos

hidroxilo ligados nas posições C2, C3 e C6 reagem com radicais livres instáveis para formar macromoléculas mais estáveis ^[19].

1.2 – Modificações químicas da quitosana

A quitosana é um biomaterial consideravelmente versátil, devido à sua elevada reatividade, sendo possível a obtenção de diversos derivados da quitosana, com diferentes propriedades e aplicações (figura 2). A quitosana pode ser modificada por reticulação polimérica (*crosslinking*) covalente ou iónica e ligação de enxertos (*grafting*) ^[26]. As reações típicas da quitosana ocorrem principalmente nos grupos amina, entre as quais, as mais importantes são as reações de N-acilação e a formação de bases de Schiff ^[2].

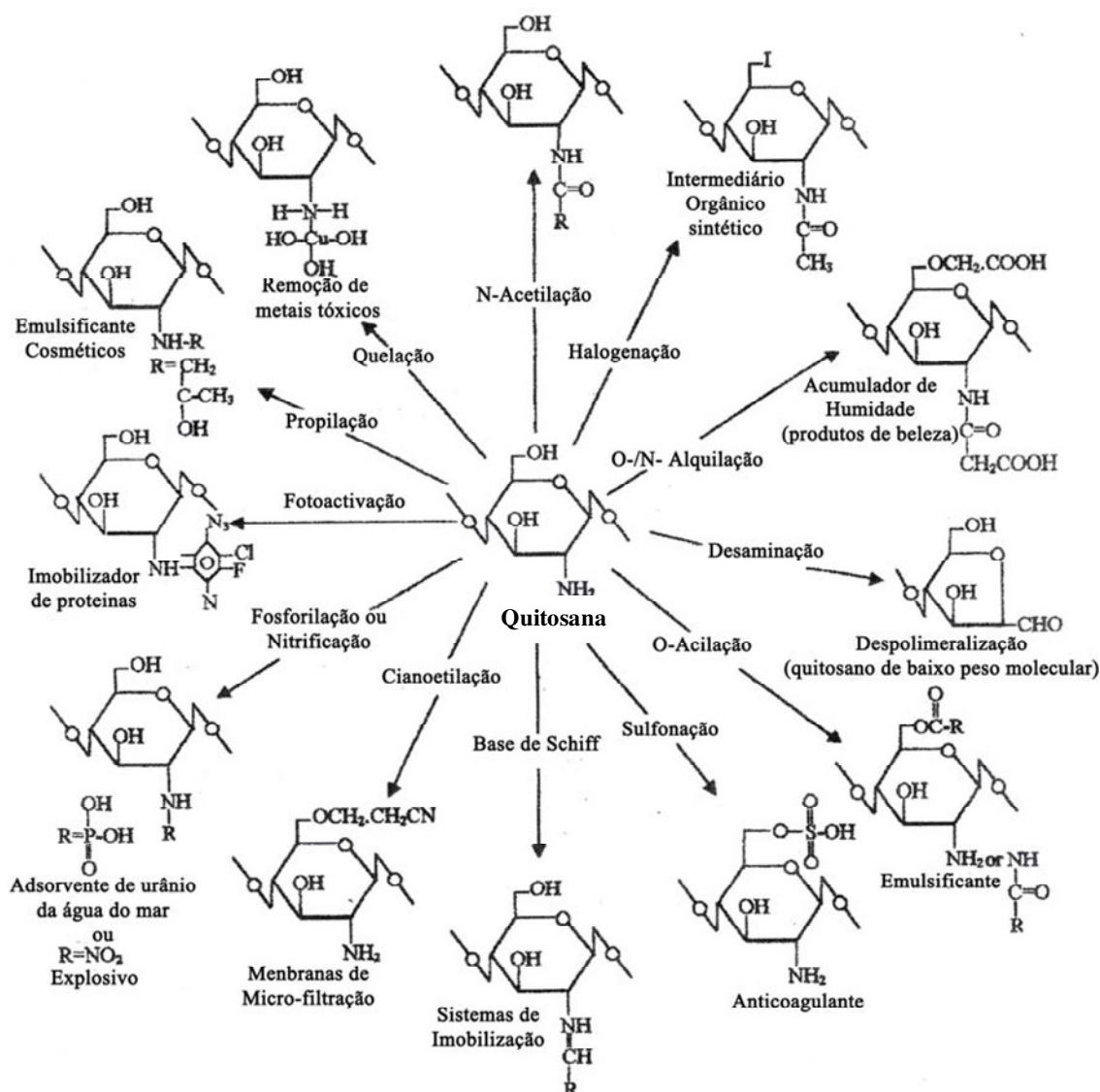


Figura 2 – Derivados e aplicações de quitosana (adaptado de Tharanathan e Kittur^[27]).

1.2.1 Reticulação da quitosana

No processo de reticulação, as cadeias poliméricas são interligadas por uma outra molécula, levando à formação de uma rede covalente tridimensional (figura 3). Estas moléculas têm, pelo menos, dois grupos funcionais reativos que permitem a ligação entre duas cadeias de quitosana em simultâneo e, normalmente, têm M_M muito menores do que o M_M dos polímeros ^[26].

A reticulação covalente tem sido amplamente utilizada para melhorar a estabilidade estrutural e para promover alterações nas propriedades físicas, químicas e mecânicas da quitosana. As alterações principais são: menor solubilidade, menor hidrofilicidade, maior capacidade de absorção, menor porosidade e consequentemente menor permeabilidade ao vapor de água, sendo que a morfologia e as propriedades reológicas e mecânicas são afetadas ^[26, 28, 29].

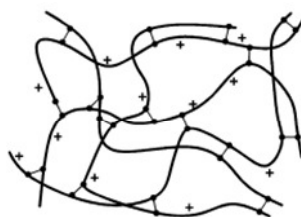


Figura 3 – Estrutura de um hidrogel de quitosana formado por polímero de quitosana com agente reticulante: —, quitosana; —•—, agente reticulante, +, carga positiva da quitosana (adaptado de Berger *et al.* ^[26]).

Até ao momento, os agentes reticulantes mais utilizados no processo de reticulação da quitosana são os dialdeídos, como o glicoxal (etanolal) e o glutaraldeído (1,5-pentanodial) ^[30, 31]. As suas reações com a quitosana estão bem documentadas, o grupo aldeído forma ligações covalentes entre os grupos amina da quitosana, formando uma base de Schiff, uma imina estável devido à ressonância que se estabelece entre ligações duplas. Os dialdeídos permitem reações diretas em meios aquosos, o que é uma vantagem relativamente à biocompatibilidade. No entanto, a principal desvantagem na utilização dos dialdeídos é que estes são sintetizados quimicamente, e, geralmente, têm efeitos tóxicos como o glutaraldeído considerado neurotóxico e o glicoxal o qual é potencialmente mutagénico ^[26, 28, 29, 32]. Outros agentes reticulantes menos tóxicos, tais como o ácido

oxálico ou a genipina, têm sido investigados como alternativas para a modificação da quitosana. O uso da genipina é uma alternativa interessante aos dialdeídos, uma vez que reage espontaneamente com os grupos amina presentes nos aminoácidos ou proteínas [33, 34] e é um composto natural não citotóxico [35].

1.2.1.1 – Genipina

A genipina (figura 4) é extraída dos frutos da *Gardenia jasminoides Ellis* (originária da China) e de Genipa americana (originária da América do Sul e México), sendo, a aglucona do genipósido que está presente em maior quantidade [28, 36]. A genipina é usada na medicina tradicional Chinesa, fitoterapia e como corante alimentar natural [36, 37]. A sua biocompatibilidade em seres humanos ainda não foi testada, mas demonstrou-se que não é citotóxico *in vitro* e que é biocompatível em ratos [26, 35].

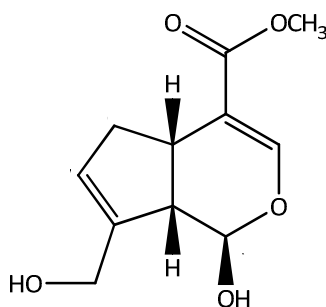


Figura 4 – Estrutura química da genipina (adaptado de Wang *et al.* [36]).

Têm surgido muitos estudos sobre o uso da genipina como agente reticulante para a quitosana. Nestes estudos foram propostos três mecanismos diferentes para a ligação covalente à quitosana. No primeiro mecanismo (figura 5), a ligação da genipina à quitosana ocorre por duas reações diferentes. Na primeira reação existe uma substituição nucleofílica que envolve a substituição do grupo éster na molécula de genipina por uma ligação amida secundária ao grupo amina da quitosana [32]. A ligação da outra molécula de quitosana ocorre por ataque nucleofílico ao átomo de carbono 3 da genipina, por parte da amina primária da quitosana, originando a formação de um aldeído intermediário, tal como se apresenta na segunda reação da figura 5. A abertura do anel é seguida por um ataque da amina secundária, formada na primeira etapa da reação, ao grupo aldeído resultante, formando um composto heterocíclico que inclui o átomo de azoto do resíduo da glucosamina da quitosana [32].

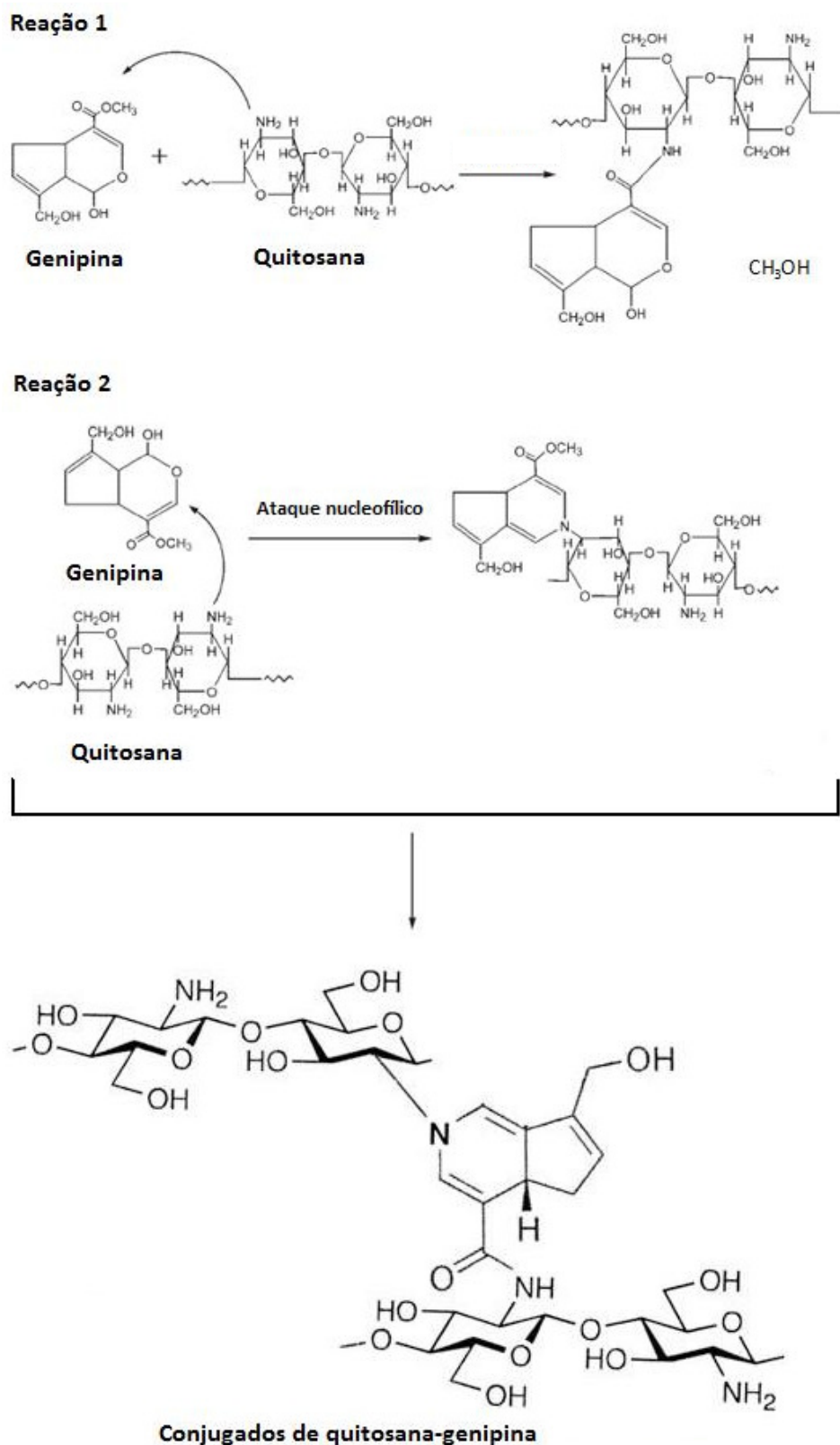


Figura 5 – Reações de ligação da genipina à quitosana pelo mecanismo 1 (adaptado de Butler *et al.*; Chen *et al.*; Muzzarelli^[28, 32, 38]).

O segundo mecanismo (figura 6) proposto para a reticulação da genipina com a quitosana é iniciado pelo ataque nucleofílico da segunda reação (figura 5) do primeiro mecanismo proposto. As diferenças deste mecanismo em relação ao primeiro começam quando o anel heterocíclico formado sofre desidratação e origina intermediários aromáticos. Os passos seguintes envolvem polimerização, dando origem a derivados heterocíclicos altamente conjugados de genipina com a quitosana. Por fim, podem-se estabelecer ligações amida secundárias por reação do grupo éster da genipina com o grupo amina da quitosana, conduzindo à formação de uma rede polimérica (figura 6) [32, 38].

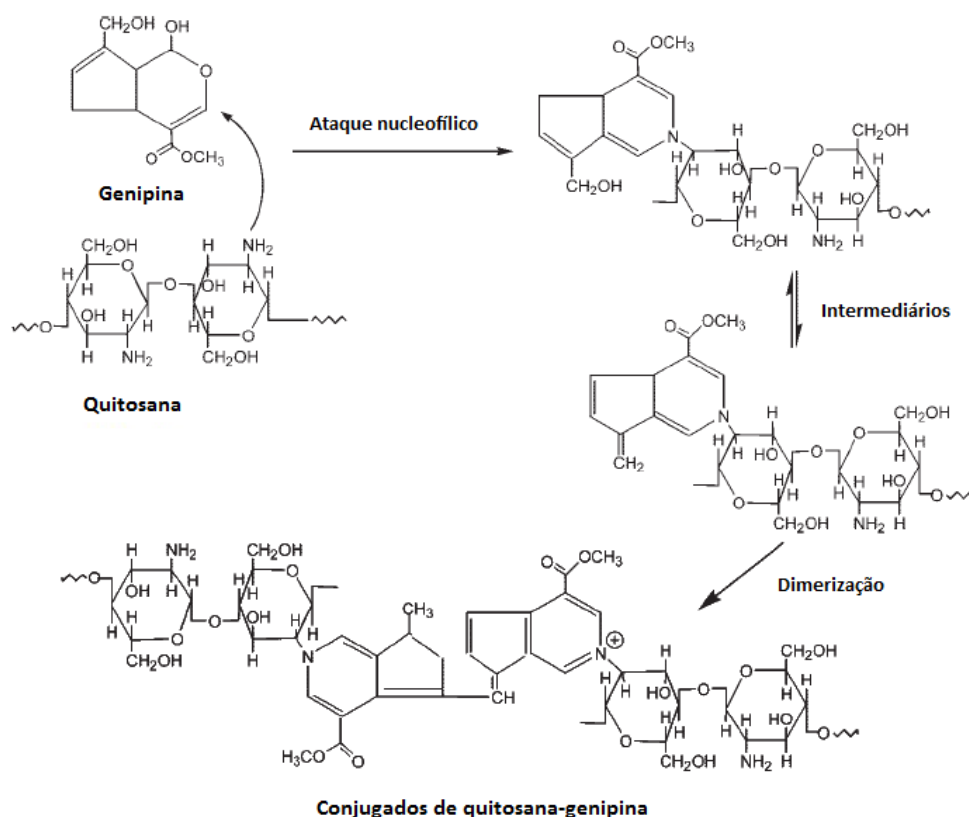


Figura 6 – Mecanismo 2 da genipina com a quitosana (adaptado de Chen *et al.* [38]).

Além dos dois mecanismos descritos anteriormente, foi descrito por Mi *et al.* [33, 39] que os intermediários referidos no mecanismo da figura 6 podem associar-se e originar dímeros, trímeros ou tetrâmeros de uma cadeia de quitosana ligada a uma molécula de genipina (monómero), em que a genipina é sempre o ponto de ligação entre os monómeros (figura 7)

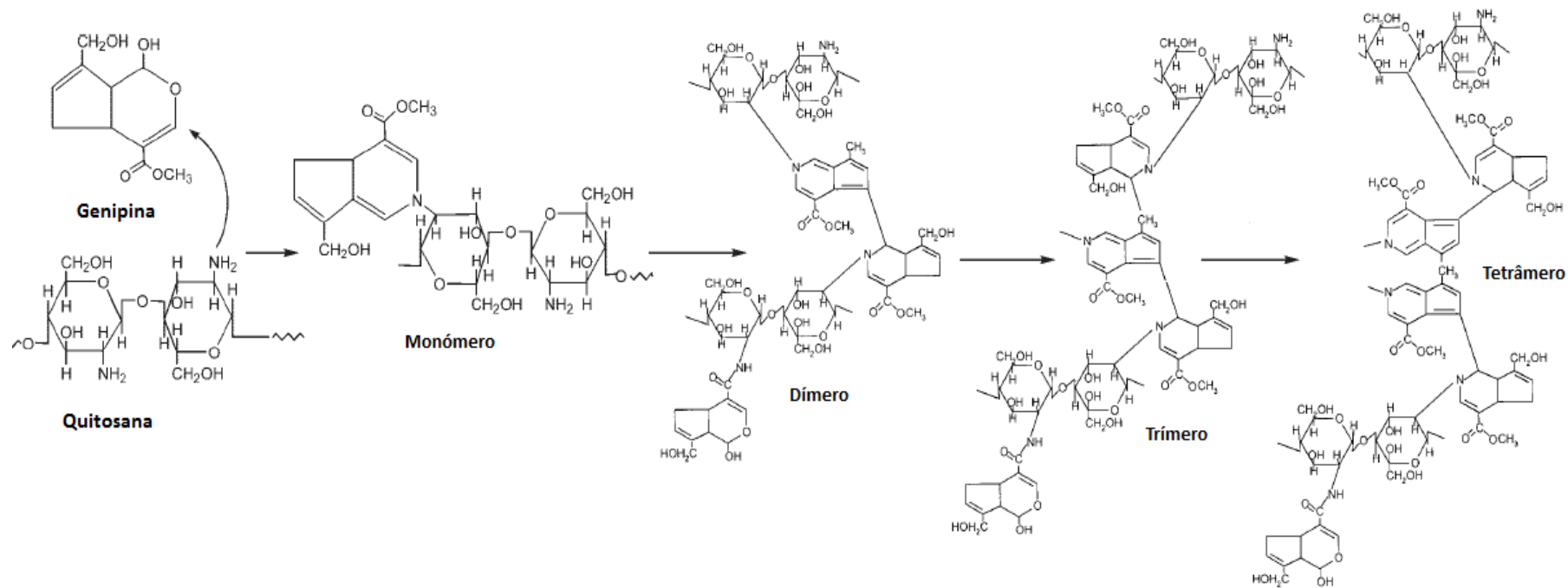


Figura 7 – Mecanismo 3 da genipina com a quitosana (adaptado de Mi *et al.*^[39]).



Neste mecanismo, as ligações entre a quitosana e a genipina ocorrem preferencialmente como na segunda reação apresentada na figura 5. Seguidamente, a ligação entre as várias moléculas de genipina para originar dímeros, trímeros e tetrâmeros ocorre entre os carbonos 6 de uma molécula e o carbono 1 de outra molécula de genipina ^[33, 39].

1.3 – Aplicações da quitosana

Como já foi descrito anteriormente, a quitosana é um material biocompatível com características funcionais e pode ser utilizada para converter subprodutos baratos em produtos de maior valor acrescentado com aplicações em várias áreas, nomeadamente, farmacêutica ^[2, 27, 28], biomédica ^[2, 27, 40, 41], alimentar ^[2, 5, 6, 27, 40, 41], tratamento de águas residuais (remoção metais pesados, floculação e/ou coagulação de corantes e proteínas, membranas de purificação) ^[6, 8, 37, 40, 41], cosméticos ^[2, 27, 40] e agricultura (revestimento de fertilizantes, agroquímicos) ^[5, 6, 27]. No entanto, os materiais com base de quitosana são mais usados na área da medicina e da biotecnologia. Em medicina, a quitosana pode ser aplicada como agente bacteriostático e fungistático, em sistemas de liberação controlada de substâncias (antimicrobianas, antioxidantes, nutrientes, aromas e drogas), em células artificiais, curativos, membranas de hemodiálise, lentes de contacto, pele artificial, suturas cirúrgicas e na engenharia de tecidos ^[40, 42]. Em biotecnologia, a quitosana pode ser aplicada como conservante, em embalagem, como aditivo para alimentação animal, clarificação de sumos de fruta, matrizes cromatográficas para suporte de imobilização de enzimas, membranas para filtração e revestimentos com atividade antioxidante e antimicrobiana ^[5, 6, 14, 27, 43].

1.3.1 – Potencialidades da quitosana como filmes/revestimentos

O interesse crescente do uso de quitosana como um revestimento, deve-se ao facto da quitosana formar géis, membranas, filmes, cápsulas e fibras, com boas propriedades biológicas, de barreira e mecânicas ^[6]. Os filmes de quitosana podem ser preparados por evaporação de solvente, neutralização, reticulação e gelificação de ionotrópicos ^[5, 40].

A principal aplicação dos revestimentos de quitosana na área alimentar é em filmes edíveis. Os filmes edíveis podem ser definidos como uma camada fina de um material comestível aplicado nos alimentos por imersão, pulverização ou como embalagem. Estes



podem originar uma barreira contra a transmissão de gases, vapores e solutos, melhorando a qualidade e estabilidade nutricional dos alimentos, permitindo em muitos casos prolongar o seu tempo de vida útil ^[1, 6, 44, 45].

Outra propriedade importante dos filmes de quitosana é a capacidade para incorporar ingredientes, tais como vitaminas, minerais, plastificantes, emulsionantes, entre outros. A incorporação destes compostos permite aumentar a funcionalidade dos filmes, nomeadamente, melhorar as suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e mecânicas. Por exemplo, a adição de plastificantes melhora as propriedades mecânicas dos filmes ^[46]. Na incorporação de compostos com atividade antimicrobiana pode referir-se a adição de lisozima em filmes de quitosana conferindo-lhe atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis* ^[44].

Alguns compostos com propriedades antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos, extratos de plantas e óleos naturais, podem ser adicionados aos filmes de quitosana para proteger os alimentos contra o stress oxidativo, a oxidação lipídica e a descoloração ^[23, 44].

O *Aloe vera* faz parte do grupo como potencial ingrediente para incorporar em alimentos ou revestimentos (engenharia de tecido, cicatrização de áreas inflamadas) devido as suas propriedades biológicas ^[47]. Um estudo de quitosana com *Aloe vera* realizado na área da saúde, *in vivo*, revelou ser uma alternativa eficiente à hiperlipidemia ^[48]. Outro estudo foi realizado com *Aloe vera* em gel e quitosana para revestir morangos, em que retardou o crescimento microbiano e a oxidação ao longo do armazenamento, aumentando o tempo de vida útil dos morangos ^[49].

1.3.1.1 – Efeito do plastificante

Os filmes de polissacarídeos, como a quitosana, geralmente são frágeis e rígidos, portanto, na preparação destes filmes incorporam-se plastificantes, na maioria dos casos componentes de baixa M_M ^[44]. Os plastificantes podem incluir vários compostos tais como, ésteres, água, oligossacarídeos, glicóis, fenóis, cetonas e éteres ^[50, 51]. Os plastificantes são, geralmente, adicionados para diminuir a tensão de rutura dos filmes e aumentar a sua capacidade de alongamento, aumentando assim a sua flexibilidade. No entanto, a alteração que produzem no filme não se traduz apenas na alteração das propriedades mecânicas, mas também nas propriedades barreira, alterando a



permeabilidade ao vapor de água e a outros gases ^[50]. Várias teorias foram propostas para explicar os mecanismos de ação do plastificante. Os plastificantes interagem com o polímero e, aumentam o espaço intermolecular, permitindo assim uma maior mobilidade das cadeias do polímero. Estes compostos atuam também como lubrificantes internos reduzindo as forças de fricção entre as cadeias ^[50-52]. A rigidez do polímero é devida às suas estruturas tridimensionais, e o plastificante reduz as interações entre os polímeros (pontes de hidrogénio, Van der Waals ou forças iónicas) e diminui a temperatura de transição vítrea, (T_g) ^[51, 52].

Segundo Suyatma *et al.* ^[51] que testou quatro plastificantes diferentes, o glicerol, o etilenoglicol, o polietilenoglicol e o propilenoglicol, em filmes de quitosana quanto à sua hidrofília e estabilidade durante o armazenamento. O autor concluiu que os plastificantes melhoram a ductilidade da quitosana, embora na maioria dos casos o efeito do plastificante diminua com o tempo de armazenamento. Srinivasa *et al.* ^[53] também efetuou um estudo sobre as propriedades mecânicas de filmes de quitosana com diferentes plastificantes, nomeadamente polióis (glicerol, sorbitol e polietilenoglicol) e ácidos gordos (ácido esteárico e palmítico). Neste estudo verificaram que os polióis diminuem a tensão de rutura e aumentam a taxa de deformação dos filmes de quitosana. Os filmes de sorbitol foram os que apresentaram maior flexibilidade e os de polietilenoglicol menor ductilidade. Enquanto que, nos filmes de quitosana plastificados com ácidos gordos não houve alteração das propriedades mecânicas, uma vez que obtiveram valores de tensão de rutura, taxa de deformação e módulo de Young idênticos aos filmes de quitosana. Arvanitoyannis *et al.* ^[46] usou sorbitol e sacarose como plastificante para misturas de filmes de quitosana com álcool polivinílico e concluiu que a deformação das misturas aumentava com a concentração de plastificante. No entanto, para concentrações altas de plastificante diminuía drasticamente tanto a força de tensão como o módulo de Young.

1.3.1.2 – Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas traduzem o comportamento dos materiais quando sujeitos a uma tensão ou deformação e têm uma grande relevância para muitas das aplicações dos filmes de biopolímeros. As técnicas mais utilizadas para a caracterização destas propriedades geralmente envolvem ensaios de extensão uniaxial. Como resultado dos ensaios de extensão uniaxial, obtém-se uma curva da tensão em função da deformação, apresentada na figura 8, a partir da qual se podem determinar diversos parâmetros mecânicos: tensão no ponto de rutura, tensão de cedência (P), módulo de Young e deformação no ponto de rutura.

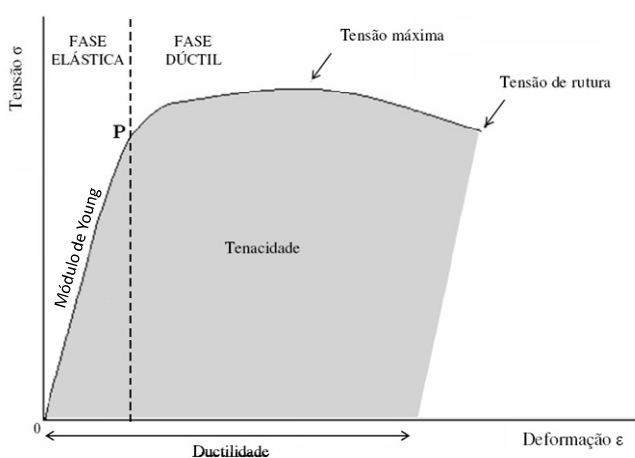


Figura 8 – Exemplo de uma curva de tensão/deformação até à rutura (adaptado de Beer and Johnston^[54]).

A lei de Hooke para sólidos ideais assume que estes ao serem submetidos a uma força irão sofrer uma deformação elástica e que após a remoção dessa força retomam a sua forma original. Esta lei traduz-se pela seguinte equação:

$$\sigma = \frac{F}{A} = E \times \varepsilon \quad \text{Equação 1}$$

Em que σ é a tensão média aplicada (Pa), F é a força aplicada (N), A é a área inicial da secção transversal (espessura x largura) do provete (m^2), E é o módulo de Young ou módulo de elasticidade do material (Pa) e ε é a deformação ou extensão do material, ou seja, $\Delta L/L_0$, onde L_0 é o comprimento inicial e ΔL é a variação de comprimento ($L-L_0$)^[54]. A lei de Hooke traduz uma relação linear e, portanto, apenas é válida na região onde o



material tem um comportamento elástico até atingir o limite de elasticidade, ponto P na curva da tensão-deformação (figura 8), ou seja, na região inicial da curva. Abaixo do limite de elasticidade, se a tensão for removida em qualquer ponto da curva o material retorna às suas dimensões originais e acima do limite P a deformação aumenta mais rapidamente com o aumento da tensão aplicada, correspondendo à fase dúctil ou plástica, na qual a deformação do material é permanente, sendo a lei de Hooke inválida. A capacidade do material absorver energia até à sua rutura é definida por tenacidade e corresponde à área sob a curva tensão em função da deformação até ao ponto de rutura. A ductilidade de um material corresponde à elongação total do material, resultante da deformação elástica e plástica.

A tensão de rutura corresponde ao máximo de tensão que o material suporta até sofrer rutura, enquanto que a tensão de cedência é o ponto em que o primeiro sinal de uma deformação não elástica ocorre (deformação plástica).

Diferentes materiais apresentam diferentes propriedades mecânicas. A figura 9 apresenta exemplos do comportamento de diferentes materiais quando sujeitos a uma tensão extensional uniaxial. Os materiais dúcteis, como é o caso dos polímeros, apresentam uma deformação elástica seguida por uma deformação plástica até atingir a rutura. Os materiais frágeis, quando submetidos aos mesmos ensaios não apresentam deformação plástica, passam da deformação elástica para a rutura. Nestes casos a tensão máxima suportada pelo material pode ter o mesmo valor que a tensão de rutura. Estas diferenças devem-se à natureza e densidade das interações intermoleculares estabelecidas entre os polímeros constituintes dos filmes, bem como da espessura dos mesmos.

Nos testes a realizar devem usar-se amostras e instrumentos adequados, de modo a que o resultado experimental traduza as propriedades intrínsecas do material. As condições sob as quais estes ensaios são realizados influenciam os resultados, nomeadamente, o tamanho das amostras, pré-acondicionamento, temperatura, humidade relativa, magnitude da força ou deformação aplicadas e velocidade de aplicação.

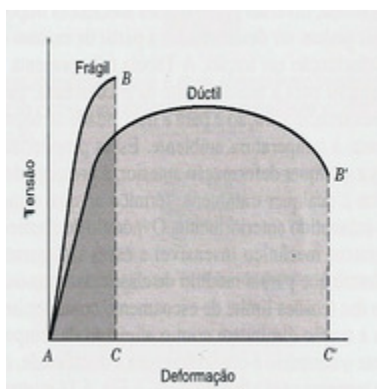


Figura 9 – Representação esquemática do comportamento tensão-deformação para materiais frágeis e dúcteis quando sujeitos a uma tensão uniaxial extensional até ao ponto de rutura (adaptado de Beer and Johnston^[54]).

Os filmes de metilcelulose, por exemplo, são considerados duros e quebradiços e os filmes à base de proteínas são flexíveis. Por sua vez, os filmes de quitosana são dúcteis e frágeis ^[44]. As propriedades mecânicas dos filmes de quitosana podem variar segundo vários parâmetros. Yoshida *et al.*^[55] propõe um estudo da influência da quantidade de plastificante (glicerol), de massas moleculares diferentes e da incorporação de lípidos (ácido palmítico, cera de abelha ou cera de carnaúba) nas propriedades mecânicas de filmes de quitosana. As conclusões retiradas deste estudo são que a adição de glicerol aumentou a taxa de deformação, ou seja, aumentou a flexibilidade dos filmes; os polímeros pré tratados com calor com M_w mais baixas não produzem filmes com boas propriedades mecânicas e a incorporação de lípidos nos filmes de quitosana diminuiu a flexibilidade dos filmes devido à sua estrutura rígida.

1.4 – Métodos para determinar atividade antioxidante

Um antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra os efeitos nocivos de processos ou reações que podem causar oxidações, inibem ou atrasam o processo de oxidação por radicais livres ^[21].

O stress oxidativo celular pode ser impedido ou minimizado recorrendo a diferentes estratégias, incluindo a utilização de barreiras físicas que inibem a geração das ROS, enzimas que neutralizam as ROS (como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase glutatona), o aprisionamento e/ou inativação de iões metálicos que inibem a geração das ROS, de que é exemplo a ação da ferritina, ou a ação de antioxidantes que interrompem o

mecanismo de oxidação radicalar, como o tocoferol (vitamina E), ácido úrico, glutathiona e flavonoides^[21].

Os métodos que podem determinar a atividade antioxidante estão divididos em duas categorias, reações de transferência de átomos de hidrogénio e reações baseadas em transferência de eletrões^[21].

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a atividade antioxidante^[56], baseados em diferentes mecanismos de reação: na captura de radicais peróxido (ORAC, TRAP), poder de redução de metais (FRAP, CUPRAC), captura de radicais hidroxilo (método de desoxirribose), captura de radicais orgânicos (ABTS, DPPH) e quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno)^[21]. Dos métodos mencionados anteriormente, o ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais utilizados^[56]. Neste trabalho utilizaram-se os métodos descritos nos pontos seguintes.

ABTS

Um dos métodos mais utilizados para avaliação da capacidade antioxidante é o método espectrofotométrico do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Neste método, o radical monocatiónico de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é inicialmente gerado por oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio, originando um cromóforo azul esverdeado, que depois é reduzido na presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ou de eletrões (figura 10). Esta redução provoca uma descoloração que pode ser convertida numa percentagem de inibição do $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e que é proporcional à concentração do antioxidante^[57].

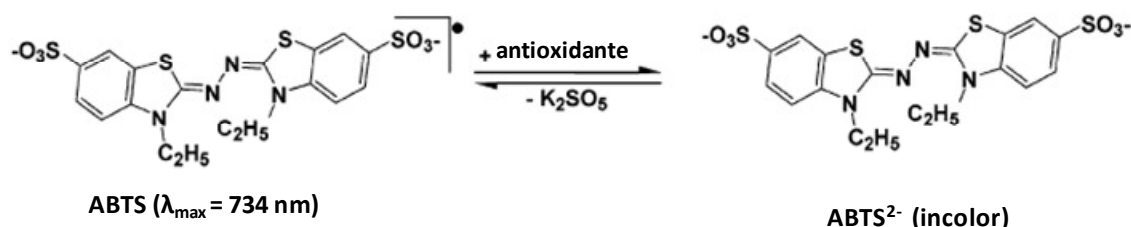


Figura 10 – Formação do catião radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (adaptado de Huang *et al.*^[58]).

FRAP

A capacidade antioxidante pode ser determinada pelo método do poder antioxidante de redução do catião ferro (III) (FRAP). O sal férrico, $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2\text{Cl}_3$ (TPTZ=2,4,6-tripiridil-s-triazina), é usado como oxidante e é preparado por mistura do TPTZ e do $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em tampão acetato (pH 3,6). Uma unidade de FRAP é definida, arbitrariamente, como a redução de 1 mol de Fe (III) para Fe (II) (figura 11). O potencial de redução do Fe^{3+} é 0,70 V, que é comparável com o do $\text{ABTS}^{\bullet-}$ (0,68 V). A principal diferença entre os métodos ABTS e FRAP é que no ABTS a reação ocorre a pH neutro e no FRAP ocorre a pH ácido (3,6). Uma desvantagem do FRAP é a de poderem ocorrer reações simultâneas na determinação da atividade antioxidante. As interferências podem ser causadas por extratos de alimentos com efeito quelante, que se ligam ao Fe (III) e formam complexos, reduzindo a quantificação por este método ^[58, 59].

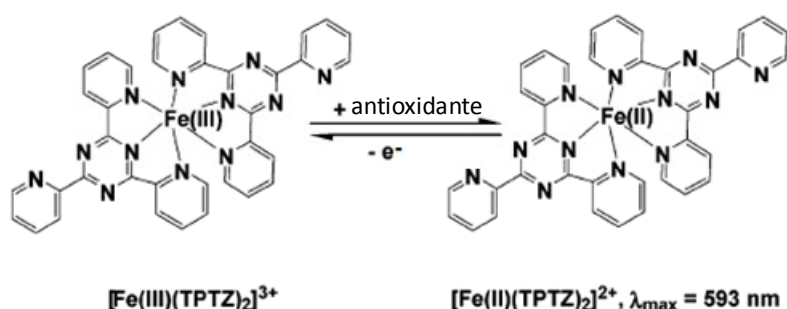


Figura 11 – Redução do Fe(III) para Fe(II) do método FRAP. (adaptado de Huang *et al.* ^[58]).

DPPH

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é um método espectrofotométrico pelo qual também pode ser determinada a atividade antioxidante por remoção de radicais livres (figura 12). O radical DPPH é estável e tem uma cor roxa com um máximo de absorvância entre 515–528 nm. Na presença de uma substância capaz de lhe doar um átomo de hidrogénio, o radical DPPH é reduzido para o seu correspondente hidrazina (cor amarelo pálido), perdendo a cor violeta da solução original que se traduz na diminuição da absorvância ^[60]. As propriedades antioxidantes dos compostos analisados são determinadas pela cinética desta reação. Tal como no método do ABTS, a percentagem de inibição de DPPH é proporcional à concentração do antioxidante. A principal



desvantagem deste método é que o DPPH apenas pode ser preparado em solventes orgânicos, o que é uma limitação para avaliar o comportamento de antioxidantes hidrofílicos.

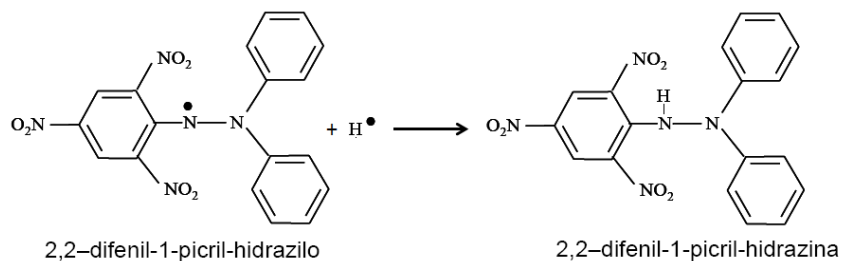


Figura 12 – Reação do método de DPPH. (adaptado de Huang *et al.*^[58]).



2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

2.1 – Sulfitos no vinho

O dióxido de enxofre (SO_2) e as muitas formas de sulfitos inorgânicos (sais de bissulfito, sulfito e metabissulfito de sódio ou potássio) são amplamente utilizados como conservantes em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos ^[61]. O dióxido de enxofre é provavelmente um dos aditivos mais versáteis e eficientes utilizados na produção de vinho com o objetivo de o conservar. O dióxido de enxofre possui um efeito antioxidante (SO_2 molecular), inibindo o desenvolvimento de algumas reações enzimáticas. Por outro lado, também apresenta propriedades anti-sépticas (SO_2 livre) que lhe permitem evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis no vinho ^[62, 63]. Além disso, o dióxido de enxofre reduz a taxa de polimerização fenólica e a perda de cor durante o envelhecimento do vinho ^[64], permitindo que os compostos fenólicos naturalmente presentes exerçam a sua função antioxidante.

A adição de dióxido de enxofre ocorre em várias fases do processo de vinificação. O mosto é tratado após o esmagamento das uvas para preservar os constituintes que são sensíveis à oxidação. A adição de dióxido de enxofre pode também acontecer depois da fermentação alcoólica para eliminar microrganismos patogénicos. Por último, em maior quantidade, essa adição ocorre antes do engarrafamento para prevenir a oxidação no vinho depois de engarrafado e para evitar o crescimento microbiológico no produto final. Quando o dióxido de enxofre é adicionado ao mosto ou vinho é estabelecido um equilíbrio entre as diversas formas moleculares desse composto. Uma parte reage com alguns compostos presentes no vinho, como aldeídos, açúcares, taninos e ácidos cetónicos ^[61]. A outra parte, denominada de dióxido de enxofre livre, está maioritariamente presente sob a forma de hidrogenossulfito (HSO_3^-), em quantidade que depende do pH do meio e da constante de acidez, esta última dependente do conteúdo de etanol e da temperatura ^[63, 65].

Geralmente, o consumo de alimentos preservados com sulfitos não constitui um problema, exceto para algumas pessoas que são deficientes na enzima natural para decompô-lo ^[66]. Nos últimos anos, tem havido inúmeros relatos de reações alérgicas aos



meios com dióxido de enxofre. Muitos consideram que o excesso de dióxido de enxofre tem efeitos tóxicos para a saúde humana, resultando em dores de cabeça, náuseas, problemas respiratórios e reações asmáticas em indivíduos sensíveis, efeitos que podem ser confundidos com os do excesso de álcool ^[64, 67, 68]. Além disso, os produtores de vinho também se preocupam com a adição de dióxido de enxofre por razões de qualidade: o seu uso excessivo pode prejudicar drasticamente a qualidade de vinho, podendo mesmo dar gostos e aromas desagradáveis ou turvar o vinho durante o armazenamento ^[68].

As preocupações referentes ao uso de dióxido de enxofre resultaram em restrições reguladoras pela organização mundial de saúde (W.H.O.) e pela organização internacional da vinha e do vinho (O.I.V.). O uso de SO₂ tem de ser controlado, sendo o nível máximo permitido na União Europeia (regulamento (CE) N.º 606/2009) de 150 mg/L para vinho tinto e 200 mg/L para vinho branco ou rosé ^[69].

Os produtores de vinho têm tentado encontrar alternativas à utilização de dióxido de enxofre devido aos efeitos negativos mencionados anteriormente. Diferentes tecnologias têm sido estudadas como alternativas ao SO₂ durante a vinificação, tais como a adição de dimetildicarbonato ^[70], adição de ácido ascórbico ^[68], uso de lisozima ^[71, 72], aplicação de campos elétricos pulsados ^[63], uso de bacteriocinas ^[73] e alta pressão hidrostática ^[74, 75]. O objetivo destes processos é a produção de um vinho com quantidades reduzidas de SO₂ mas mantendo as suas características sensoriais e nutricionais. No entanto, nenhuma das alternativas assegura a estabilidade microbiológica do vinho enquanto o protege da oxidação e mantém as suas propriedades organoléticas ^[65, 68, 76].

2.2 – Objetivos do trabalho

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver filmes com base em quitosana insolúveis em soluções hidroalcoólicas ácidas, como é o caso do vinho, e com atividade antioxidante, como uma alternativa à adição de dióxido de enxofre para conservar as propriedades do vinho. A substituição ou redução do uso de dióxido de enxofre no vinho deve ser realizada por metodologias que assegurem a estabilidade microbiológica enquanto protegem o vinho da oxidação e mantêm as suas propriedades organoléticas.

Numa primeira fase foi efetuado o estudo das melhores condições para a preparação dos filmes com as características pretendidas. Com este objetivo, na preparação dos filmes foi



testado o efeito da M_M da quitosana, do plastificante e da quantidade e tempo de reação do agente reticulante (a genipina). Após a otimização da preparação dos filmes, foi estudada a incorporação de compostos com atividade antioxidante, extrato de *Aloe vera* ou oligoquitosanas, com o intuito de obter filmes com uma atividade antioxidante superior.

Por último, efetuou-se uma avaliação preliminar da influência de filmes de quitosana desenvolvidos nas características físico-químicas e sensoriais do vinho tinto e branco ao longo do armazenamento.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Origem dos materiais

Extrato de *Aloe vera*, ACTIVAloe® Aloe vera Gel QM200X Flakes, USA.

Genipina (G), Challenge Bioproducts Co., Taiwan.

Quitosana de baixa viscosidade (Q_{FBV}), ≤ 200 mPa.s, Fluka, Alemanha.

Quitosana de média viscosidade (Q_{FMV}), 200 – 400 mPa.s, Fluka, Suíça.

Quitosana de alta viscosidade (Q_{FAV}), ≥ 400 mPa.s, Fluka, Japão.

Quitosana de média viscosidade (Q_{SMV}), 200 – 400 mPa.s, Sigma, Japão.

Oligoquitosanas (OQs), Yaizu Suisankagaku Industry, Japão.

3.2 – Determinação do grau de acetilação da quitosana

O GA das amostras de quitosana foi determinado por uma desacetilação, seguida de uma micro extração em fase sólida do espaço de cabeça e análise por cromatografia gasosa com um detetor por ionização de chama (HS-SPME-GC-FID). Este método dividiu-se em duas etapas: (1) desacetilação das amostras para libertar o ácido acético e (2) análise do ácido acético libertado por HS-SPME-GC-FID.

As condições de desacetilação usadas foram baseadas no método desenvolvido por Holan *et al.*^[77] e alterado por Niola *et al.*^[78]. Para a desacetilação colocou-se uma mistura de 3,6 mL H_2SO_4 72 % e de 2,4 mL ácido oxálico (1,4 mM) num tubo (14 mL) contendo 2 mg da amostra. A hidrólise ácida foi realizada a 110 °C durante 40 minutos num bloco de aquecimento. Os dois ácidos utilizados agem em cooperação, o H_2SO_4 despolimeriza a amostra para torná-la acessível para a ação do ácido oxálico^[79].

O conteúdo em ácido acético, libertado após a desacetilação, foi determinado por HS-SPME-GC-FID. As amostras foram termostatizadas a 40 °C num banho com agitação constante. Depois de 15 minutos, a fibra de SPME (Supelco, Inc., Belfont, PA, USA) revestida com 50/30 μm divinilbenzeno/carboxano/polydimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), acondicionada previamente, a 250 °C durante 30 minutos (de acordo com as recomendações do fabricante) foi colocada manualmente através do septo de teflon no espaço de cabeça do tubo e exposta durante 30 minutos. Ao fim desse tempo a



fibra de SPME contendo ácido acético foi introduzida no injetor do GC-FID a 250 °C e mantida durante 3 min para a dessorção dos compostos ^[80]. O ácido acético foi quantificado utilizando uma curva de calibração obtida com padrões de ácido acético (0,1-1,0 g/L). As análises foram efetuadas num cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400, equipado com uma coluna capilar DB-FFAP (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro, 0,25 Å de espessura), tendo sido utilizado como gás de arraste o hidrogénio. O programa de temperaturas do forno do equipamento realizou-se entre 50 e os 220 °C, com três rampas, 5 °C/min até 65 °C; 20 °C/min até 185 °C e 35 °C/min até 220 °C, durante 1 min.

3.3 – Preparação de filmes de quitosana

Preparou-se uma solução aquosa de quitosana 1,5 % (m/v) em ácido acético 0,1 M. Para isso dissolveu-se o polissacarídeo, com agitação constante à temperatura ambiente durante cerca de 16 horas, e filtrou-se a mistura sob vácuo por um funil de placa porosa (G2). A esta solução adicionou-se o plastificante pretendido (glicerol ou sorbitol) na quantidade desejada (0,75-2 %) (m/v). Esta mistura foi colocada num banho de água a 50 °C, durante 10 minutos de modo a promover a sua homogeneização. Posteriormente, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente, e desgaseificada sob vácuo. De seguida, transferiu-se 31 g da solução para placas de plexiglass 12 x 12 cm (área útil de 144 cm²), de modo a manter constante a massa total massa total de polímero por área (g/cm²). As placas, previamente colocadas num suporte e niveladas, foram colocadas em estufa a 35 °C durante cerca de 16 horas para a formação do filme por evaporação do solvente. Estes filmes de quitosana foram designados por “Q”.

3.3.1 – Preparação de filmes de quitosana com um agente reticulante, a genipina

A preparação dos filmes de quitosana com reticulação por intermédio da genipina realizou-se com base no descrito no ponto 3.3, com a exceção que após arrefecimento da mistura quitosana-glicerol (0,75 %) (m/v), adicionou-se 250 µL de uma solução de genipina 10 % (m/v) em etanol, sob agitação constante, para obter uma concentração final de 0,05 % (m/v). Deixou-se reagir durante uma hora, desgaseificou-se e colocou-se a mistura em placas, tal como descrito no ponto 3.3. As placas, previamente colocadas num suporte e niveladas, foram mantidas à temperatura ambiente durante 2, 4, 6, 8, 12 e 24



horas para ocorrer a reação entre a quitosana e a genipina (para os filmes preparados nos pontos 4.2.1 e 4.2.2 o tempo de reação foi de 2 h). Ao fim do tempo de reação, colocaram-se as placas em estufa a 35 °C durante cerca de 16 horas para a formação do filme por evaporação do solvente. Estes filmes tiveram a designação por “Q+G”.

3.3.2 – Preparação de filmes de quitosana com genipina e incorporação de *Aloe vera* ou oligoquitosanas

A preparação dos filmes de quitosana com genipina e incorporação de *Aloe vera* ou oligoquitosanas realizou-se como descrito no ponto 3.3.1, adicionando-se extrato de *Aloe vera* (0,125 % – 0,25 % (m/v)) ou extrato de oligoquitosanas (0,05 % – 5 % (m/v)) à mistura quitosana-plastificante (0,75 %)-genipina (0,05 %) depois de já ter reagido 1 h, reagiu mais 30 minutos sob agitação moderada, desgaseificou-se e colocou-se a mistura em placas, tal como descrito no ponto 3.3. Estes filmes foram designados por “Q+G+A” no caso da incorporação do extrato de *Aloe vera* e por “Q+G+OQs” no caso da incorporação de oligoquitosanas.

3.4 – Caracterização dos filmes

3.4.1 – Humidade

A determinação da humidade dos filmes foi realizada por secagem até peso constante. As amostras de filme a testar (quadrado de filme com cerca de 4 cm²) foram rigorosamente pesadas em cápsulas de vidro, previamente acondicionadas a 105 °C durante 2 horas, arrefecidas e taradas. As cápsulas com os filmes foram colocadas na estufa a 105 °C durante pelo menos 16 horas. As cápsulas foram deixadas a arrefecer (30 minutos) num exsiccador e em seguida foram novamente pesadas. A percentagem de humidade foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ humidade} = \left(\frac{m_{\text{filme } i} - m_{\text{filme } f}}{m_{\text{filme } i}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde $m_{\text{filme } i}$ é o valor da massa inicial do filme, o $m_{\text{filme } f}$ é o valor da massa final do filme após retirada a água. A determinação de humidade foi realizada em triplicado.



3.4.2 – Solubilidade dos filmes em água e solução modelo de vinho

A solubilidade dos filmes foi determinada em duas matrizes diferentes: matriz água com azida de sódio (0,02 % (m/v)) para evitar o crescimento microbológico, e a matriz modelo de vinho, constituída por etanol 10 % e pH 3,5 ajustado com ácido clorídrico (2 M).

A solubilidade foi determinada por diferença de massa, antes e depois dos filmes estarem mergulhados nas soluções matrizes, durante determinado período de tempo. Um quadrado de filme (4 cm²) foi primeiro pesado e depois colocado em 30 mL de solução à temperatura ambiente num agitador orbital (80 rpm). Os filmes foram deixados nas matrizes durante 1, 3, 7 e 15 dias e no final colocaram-se na estufa a 105 °C cerca de 16 h. Após arrefecerem num exsicador durante 30 minutos foram pesados. A solubilidade dos filmes foi determinada pelas seguintes equações:

$$m_{\text{filme i seco}} = m_{\text{filme i}} \times \left(100 - \left(\frac{\% \text{humidade}}{100} \right) \right) \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Solubilidade} = \left(\frac{m_{\text{filme i seco}} - m_{\text{filme f seco}}}{m_{\text{filme i seco}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde $m_{\text{filme i}}$ é o valor da massa inicial do filme, a $\% \text{humidade}$ é o valor determinado no ponto 3.4.1 no mesmo dia em que se iniciaram os ensaios de solubilidade, $m_{\text{filme i seco}}$ é o valor da massa inicial do filme após retirada a percentagem de humidade e $m_{\text{filme f seco}}$ é o valor da massa final do filme seco depois de ter estado mergulhado na solução matriz. Todos os ensaios para a determinação de solubilidade foram realizados em triplicado.

3.4.3 – Determinação da atividade antioxidante dos filmes

3.4.3.1 – ABTS

A atividade antioxidante dos filmes produzidos e de soluções de quitosana, genipina, *Aloe vera*, oligoquitosanas, glicerol e sorbitol foi determinada por uma adaptação do método de remoção de radicais do ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS, descrito por Re *et al.*^[57].

Preparou-se uma solução de ABTS 7 mM em persulfato de potássio 2,45 mM. Deixou-se esta solução a reagir no escuro, à temperatura ambiente, durante 12-16 horas para a



formação do ABTS^{•+}. Diluiu-se 1 mL da solução de ABTS^{•+} em 80 mL de etanol e a absorvância a 734 nm desta solução foi medida num espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis) para ajustar a concentração da solução de modo a ter valores de absorvância entre 0,7 e 0,8. Um quadrado de filme com 1 cm² foi colocado em 3 mL de solução de ABTS^{•+} e deixou-se reagir no escuro. A absorvância a 734 nm da solução de ABTS^{•+} foi medida ao longo do tempo, assim como a absorvância da solução de ABTS sem filme. A atividade antioxidante dos filmes foi determinada pela percentagem de inibição, calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{abs_{\text{branco}} - abs_{\text{amostra}}}{abs_{\text{branco}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde abs_{branco} é o valor da absorvância do ABTS^{•+} (sem filme) e abs_{amostra} é o valor da absorvância do ABTS^{•+} com a amostra (filme).

Para a quitosana, genipina, *Aloe vera*, oligoquitosanas, glicerol e sorbitol, 50 µL de uma solução com concentração adequada foram colocados em 1 mL de solução de ABTS^{•+} e deixou-se reagir no escuro. A absorvância a 734 nm da solução de ABTS^{•+} foi medida ao fim de 30 min. A atividade antioxidante das soluções foi determinada pela percentagem de inibição calculada pela equação 5 em que abs_{amostra} é o valor da absorvância do ABTS^{•+} com amostra. A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração (percentagem de inibição em função da concentração) de trolox em que a concentração variou entre 0 – 455 µM. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.4.3.2 – DPPH

A atividade antioxidante dos filmes produzidos determinada pelo método do DPPH foi realizada segundo a metodologia descrita por Huang *et al.*^[58]. Sucintamente, 1,25 mg de DPPH foi diluído em 50 mL de etanol. Seguidamente, a absorvância a 517 nm desta solução foi medida num espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis) e a concentração da solução foi ajustada de modo a ter valores de absorvância entre 0,7 e 0,8. Um quadrado de filme com 1 cm² de área foi colocado em 3 mL de solução de DPPH e deixou-se reagir no escuro. A absorvância a 517 nm da solução de DPPH foi medida ao longo do tempo,



assim como a absorvância da solução de DPPH sem filme. A atividade antioxidante dos filmes foi determinada pela percentagem de inibição calculada pela equação 6 referida no ponto anterior. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.4.3.3 – FRAP

O método de FRAP foi realizado segundo o método descrito por Benzie *et al.*^[59]. A solução de FeCl₃ (20 mM) foi preparada em água destilada, e a solução de TPTZ 10 mM foi preparada em 40 mM de HCl. O reagente de FRAP foi preparado misturando 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL da solução de FeCl₃ com 25 mL de um tampão acetato (0,3 M; pH 3,6) e 3 mL de água. Seguidamente, a 3 mL da solução de FRAP foi adicionado um quadrado de filme com 0,25 cm² e a absorvância foi lida a 595 nm ao fim de 60 minutos. A atividade antioxidante dos filmes foi determinada retirando a absorvância do FRAP (sem filme) à absorvância do FRAP com amostra (filme).

Para a quitosana, genipina, *Aloe vera*, oligoquitosanas, glicerol e sorbitol, 50 µL de uma solução com concentração adequada foram colocados em 1 mL de solução de FRAP e deixou-se reagir. A absorvância a 595 nm da solução de FRAP foi medida ao fim de 30 min. A atividade antioxidante das soluções foi determinada retirando a absorvância do FRAP (branco) à absorvância do FRAP com amostra (solução). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração (absorvância em função da concentração) de trolox (0 – 455 µM) obtida ao mesmo tempo que as amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.4.4 – Determinação das propriedades mecânicas

Os filmes preparados anteriormente foram cortados em amostras retangulares com as dimensões de 9 × 1 cm. Os filmes foram acondicionados numa câmara com uma solução saturada de nitrato de magnésio, sob condições controladas de humidade e temperatura (50 ± 5 % de humidade relativa e 22 ± 5 °C de temperatura) durante cerca de 48 horas. Após o acondicionamento, procedeu-se à medição da espessura das amostras, utilizando um micrómetro digital (Mitutoyo Corporation) e efetuaram-se os ensaios de tensão até à rutura do filme num texturómetro TA-Hdi (Texture Analyser da Stable Micro Systems). Os

filmes foram colocados na vertical entre duas garras revestidas com borracha, deixando cerca de 5 cm de filme exposto. Os ensaios de tensão até à rutura basearam-se no método padrão ASTM D 882-83. Os filmes foram submetidos a uma deformação extensional devido à aplicação de uma taxa de deslocamento de 0,5 mm/s até à rutura da amostra. Através das curvas de tensão versus deformação obtidas, calcularam-se os seguintes parâmetros mecânicos: tensões no ponto da rutura, alongamento no ponto da rutura e módulo de Young. Estes ensaios foram realizados a uma temperatura de 24 ± 2 °C e 40 ± 5 % de humidade relativa^[81]. Foram analisadas 9 réplicas por cada tipo de filme.

3.4.5 – Determinação do ângulo de contacto

O ângulo de contacto foi determinado através do sistema de ângulos de contacto OCA 20 da Dataphysics. Utilizou-se como líquido de teste a água ultra pura. Colocou-se uma gota de água de 3 µL, doseada automaticamente por uma seringa, na superfície do filme. A evolução da forma da gota foi gravada com uma câmara associada ao sistema. O cálculo dos ângulos de contacto foi efetuado utilizando um software (dataphysics SCA20_M4) de análise de imagens segundo o método da elipse. O ângulo de contacto resultante entre o contorno exterior da gota e a superfície do filme é designado por ângulo θ , sendo definido como o ângulo entre o plano tangente à gota de água no ponto de contacto de equilíbrio na interface filme/água/vapor e o plano onde está depositada a gota, de acordo com a figura 13. Os valores finais correspondem à média de 9 determinações (colocaram-se 9 gotas de água ultra pura em diferentes locais do filme).

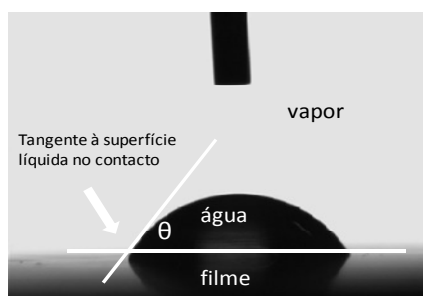


Figura 13 – Esquema do ângulo de contacto para uma gota de água molhante sobre a superfície do filme.



3.5 – Análise dos vinhos ao longo do tempo

Um vinho tinto mono casta Touriga Nacional (T) e vinho branco mono casta Encruzado (B) foram produzidos segundo o processo de vinificação normalmente utilizado pela empresa vitivinícola Dão Sul S.A. No fim da fermentação alcoólica, altura em que normalmente é adicionado o SO₂, um filme de quitosana de média viscosidade com genipina (0,05 %; 24 h) e glicerol (0,75 %) (100 cm²) foi colocado em cada garrafa de vinho (750 mL). Os vinhos foram analisados ao fim de 2 e 8 meses de armazenamento quanto à sua atividade antioxidante, quantidade de compostos fenólicos e taninos totais, cor (intensidade, tonalidade, CIELab) e crescimento microbiológico (bactérias e leveduras). Ao fim de oito meses de armazenamento foi também realizada uma análise sensorial.

Vinho tinto e branco sem adição de dióxido de enxofre (SO₂) e com adição de 40 mg/L SO₂ foram também analisados para comparar com as amostras de vinho em que foram adicionados os filmes de quitosana. Os 40 mg/L de SO₂ correspondem à concentração normalmente utilizada na indústria dos vinhos para conservar o vinho durante o armazenamento para comercializar.

3.5.1 – Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos vinhos foi determinada quando os filmes foram colocados (no fim da fermentação alcoólica) e ao longo do armazenamento, ao fim de 2 e 8 meses. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do ABTS conforme descrito anteriormente no ponto 3.4.3.1, excetuando o tempo de reação que foi de 15 minutos. As amostras de vinho branco foram diluídas 5 vezes e de vinho tinto 60 vezes. As determinações foram efetuadas em triplicado.

3.5.2 – Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método do Folin-Ciocalteu, descrito por Huang *et al.*^[58].

A 0,125 mL de amostra diluída apropriadamente (diluição de 2 vezes para as amostras de vinho branco e 10 vezes para as de vinho tinto) adicionaram-se 0,5 mL de água e 0,125 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e deixou-se reagir durante 5 minutos. Seguidamente,



adicionou-se 1,25 mL de Na_2CO_3 75 g/L e 1 mL de água destilada e deixou-se reagir durante 90 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 760 nm. Os compostos fenólicos totais foram quantificados utilizando uma curva de calibração obtida com ácido gálico (entre 0 e 250 mg/L).

3.5.3 – Taninos totais

A quantidade de taninos totais foi analisada com base no método descrito por Ribéreau e Stonestreet^[82] e Darné^[83]. Esta análise baseia-se na reação de decomposição dos taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas) que são compostos sem cor e, que em meio ácido e por ação da temperatura são hidrolisados, libertando compostos corados, as antocianidinas. Prepararam-se diluições dos vinhos (1 mL em 50 mL de água-etanol 10 % (v/v) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH 3,20) e a 4 mL dessa solução diluída adicionaram-se 2 mL de água destilada e 6 mL de HCl 37 %. Os tubos foram rolhados e aquecidos num banho a 100 °C durante 30 minutos. Simultaneamente, preparou-se uma solução de referência com a mesma composição das soluções anteriores, mas sem levar ao aquecimento. Após o aquecimento, os tubos foram arrefecidos em água fria e mantidos ao abrigo da luz durante 10 minutos. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de etanol e agitou-se no vórtex. Por último, mediu-se a absorvância de cada solução a 520 nm num espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis. O valor de absorvância para cada amostra foi obtido subtraindo o valor de cada ensaio pelo valor de absorvância da solução de referência (Δabs). A concentração em procianidinas totais foi calculada usando uma curva de calibração obtida por Darné^[83] a partir de uma mistura de procianidinas oligoméricas (equação 6). Cada amostra foi analisada em triplicado.

$$[\text{vinho}] \text{ (g/L)} = 19,33 \times \Delta\text{abs} \quad \text{Equação 6}$$

3.5.4 – Medição da cor

Para a medição da cor dos vinhos foram usados dois métodos espectrofotométricos. Para o primeiro método, as características cromáticas são expressas pela intensidade, que é dada pela soma das absorvâncias para as radiações de comprimento de onda iguais a 420,

520 e 620 nm, e pela tonalidade que representa a razão entre a absorvância a 420 nm e a 520 nm ^[84].

O segundo método, o sistema CIELab, foi utilizado para a quantificação e medição da cor. Este sistema está organizado segundo um sistema de coordenadas cartesianas retangulares que traduzem com maior precisão a sensibilidade humana em relação à cor. São três os elementos base que caracterizam uma cor: a luminosidade (L), a tonalidade e a cromaticidade. A luminosidade (L) corresponde à transmitância e varia inversamente com a densidade da cor do vinho. Os valores de luminosidade oscilam entre 0 (para uma amostra completamente opaca) e 100 (para uma amostra completamente transparente). A tonalidade e a cromaticidade exprimem-se pelas coordenadas de a^* e b^* , que indicam dois eixos de cores antagónicas: o eixo a^* que varia de vermelho ($+a^*$) a verde ($-a^*$) e o eixo b^* que varia de amarelo ($+b^*$) a azul ($-b^*$). Para ambos os eixos, o zero indica cinzento neutro (figura 14) ^[85].

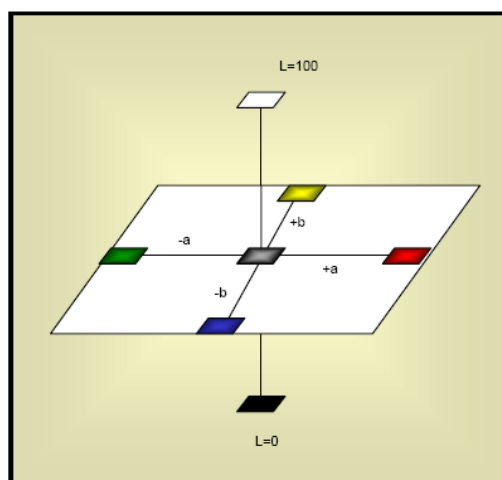


Figura 14 – Desenho esquemático representativo do Sistema CIELab.

Para a determinação das coordenadas do espaço CIELab procedeu-se à determinação do espectro de transmitância dos vinhos entre 400 e 700nm. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV-vis (Perkin Elmer, Lambda 35) utilizando uma esfera de integração. Cada ensaio foi efetuado em triplicado.



3.5.5 – Análise microbiológica

Para verificar a estabilidade microbiológica dos vinhos ao longo do período de armazenamento foram realizadas análises microbiológicas de amostras diluídas do vinho, ao fim de 2 e 8 meses. As análises foram efetuadas por inoculação em placas com meios específicos para bactérias totais (Wallerstein diferencial agar - Fluka) e para leveduras (Rose bengal chloramphenicol agar - Fluka). As condições de incubação foram de 48 horas a 37 °C e de 5 dias a 25 °C para bactérias e leveduras, respetivamente.

3.5.6 – Análise Sensorial

A análise sensorial dos vinhos brancos e tintos sem adição de sulfuroso, com adição de sulfuroso 40 mg/L e do vinho com filmes de quitosana (Q), foi efetuada ao fim de oito meses, por um painel de 7 provadores. Avaliaram-se parâmetros como a cor (amarelo, verde, castanho e limpidez para o vinho branco; vermelho, violeta, castanho e limpidez para o vinho tinto), o aroma (frutado, floral, fruta cozida e equilíbrio para o vinho branco; frutado, floral, compota, especiarias, cabedal, metálico e equilíbrio para o vinho tinto) e o gosto (corpo, acidez, amargo, persistência e equilíbrio para o vinho branco; corpo, acidez, amargo, persistência, adstringência e equilíbrio para o vinho tinto). Foi entregue a cada provador uma ficha de degustação, para avaliação dos vários parâmetros de acordo com uma escala de 1 a 6 (1 - inexistente; 2 - ligeiro; 3 - pouco intenso; 4 - intenso; 5 - bastante intenso; 6 - muito intenso) e para a apreciação global utilizando uma escala de 0 a 20.

3.6 – Análise Estatística

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante, solubilidade, propriedades mecânicas, ângulo de contacto, compostos fenólicos totais, taninos totais e cor foram avaliados estatisticamente de forma a verificar qual ou quais são significativamente diferentes. Tal avaliação foi realizada com recurso aos testes F e t-student com um nível de significância de 95% (ferramentas do Microsoft Excel 2007). As diferenças foram aceites como significativas quando $p \leq 0,05$.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Otimização da preparação de filmes de quitosana

Neste trabalho foi necessário otimizar as condições para produzir um filme com atividade antioxidante que fosse insolúvel em meio hidroalcoólico ácido. Com o objetivo de diminuir a solubilidade dos filmes foi estudada a influência da adição de um agente reticulante, a genipina. Assim, para selecionar a quitosana e as melhores condições de preparação dos filmes de forma a se atingirem os objetivos acima mencionados, numa primeira fase prepararam-se filmes com quitosanas de massas moleculares diferentes, alta, média e baixa viscosidade. Uma vez que a origem e método de obtenção da quitosana influencia as suas propriedades, quitosana de duas marcas (Sigma e Fluka) foram também testadas na preparação dos filmes. A concentração de agente reticulante e a extensão da reação de reticulação sobre a capacidade antioxidante e solubilidade dos filmes também foi avaliada.

4.1.1 – Efeito da massa molecular da quitosana

As atividades antioxidantes dos filmes de quitosana e quitosana com genipina preparados com quitosanas de diferentes massas moleculares (alta, média e baixa viscosidade) são apresentadas na figura 15.

Os filmes de quitosana apresentaram atividade antioxidante superior aos filmes de quitosana com genipina com a mesma M_M , com exceção do filme de quitosana de alta viscosidade que apresentou um valor idêntico ao filme com genipina. Os filmes que apresentaram maior atividade antioxidante foram os de quitosana de baixa M_M , nomeadamente 90 % de inibição ao fim de 6h para o filme de quitosana e 59 % de inibição ao fim de 30h para o filme de quitosana com genipina. Estes valores são muito superiores aos obtidos para os filmes produzidos com quitosana de M_M média (30 % de inibição para o filme de quitosana e 14 % para o filme de quitosana com genipina).

A quitosana de alta viscosidade apresenta um GA superior (23,5 %) e significativamente superior ao GA das quitosanas de média e baixa viscosidade da Fluka (4,3 e 11,6 %, respetivamente) (figura 15). Este facto pode também influenciar a atividade antioxidante

dos filmes, uma vez que a atividade antioxidante diminui com o aumento do GA^[8]. Assim, o valor inferior de atividade antioxidante obtido para quitosana de M_M alta em relação à quitosana de M_M média e baixa (figura 15a) pode ser devido não só à diferença na M_M mas também ao GA. No entanto, para os filmes de quitosana com genipina a atividade antioxidante é igual para os filmes de média e alta viscosidade.

Os filmes com quitosana e genipina têm menor atividade antioxidante que os filmes de quitosana com a mesma M_M , este facto pode estar relacionado com a reticulação da genipina à quitosana diminuir os grupos amina livres da quitosana para captar os radicais livres.

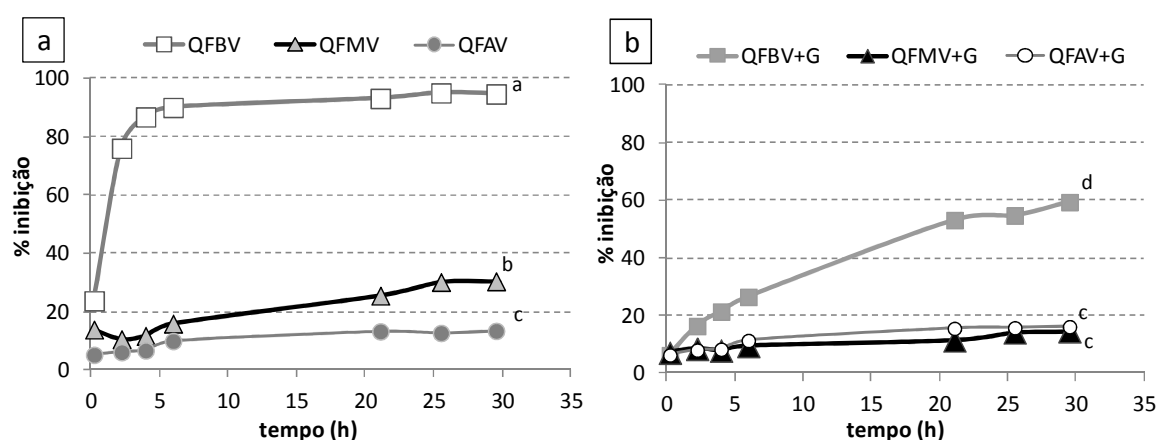


Figura 15 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de (a) quitosana (1,5 %) e (b) quitosana com genipina (0,05 %) de alta, média e baixa viscosidade. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito num estudo sobre o efeito da M_M da quitosana na atividade antioxidante do sumo de maçã, em que a quitosana com melhor atividade antioxidante radicalar é a de baixa M_M ^[24].

Na figura 16 estão apresentados os resultados da solubilidade (percentagem de perda de massa), em solução modelo de vinho e em água dos filmes preparados com as quitosanas de massas moleculares diferentes (alta, média e baixa viscosidade) com e sem genipina.

Na matriz de vinho os filmes de quitosana de alta, média e baixa viscosidade têm solubilidades idênticas (figura 16a). No entanto, na água a solubilidade diminui com a M_M , sendo inferior para os filmes de quitosana de baixa viscosidade (figura 16b). Em ambas as

matrizes, os filmes de quitosana com adição de genipina apresentam uma solubilidade significativamente inferior (no mínimo, 19 %) aos filmes apenas de quitosana. Este resultado comprova que a genipina funciona de forma eficiente como reticulante para as quitosanas de diferentes massas moleculares. A adição do reticulante promove a ligação entre os grupos amina da quitosana levando à formação de uma rede covalente tridimensional, provocando alterações nas propriedades físicas do filme, nomeadamente a solubilidade ^[28]. Os filmes preparados com quitosana de baixa e alta viscosidade e genipina apresentaram percentagens de perda de massa que não são significativamente diferentes (25 %) em ambas as matrizes. Enquanto que, os filmes de quitosana de média viscosidade são os que apresentaram solubilidade significativamente inferior (13 %). No caso da quitosana de alta viscosidade esta solubilidade superior pode dever-se ao facto desta possuir cadeias lineares mais longas, que podem estar associadas entre si e por isso dificultar a ligação da genipina aos grupos amina, enquanto que, para a quitosana de baixa viscosidade pode dever-se ao facto de esta ter maior número de cadeias de tamanho inferior e a genipina presente não ser suficiente para fazer a reticulação com todas as cadeias de quitosana.

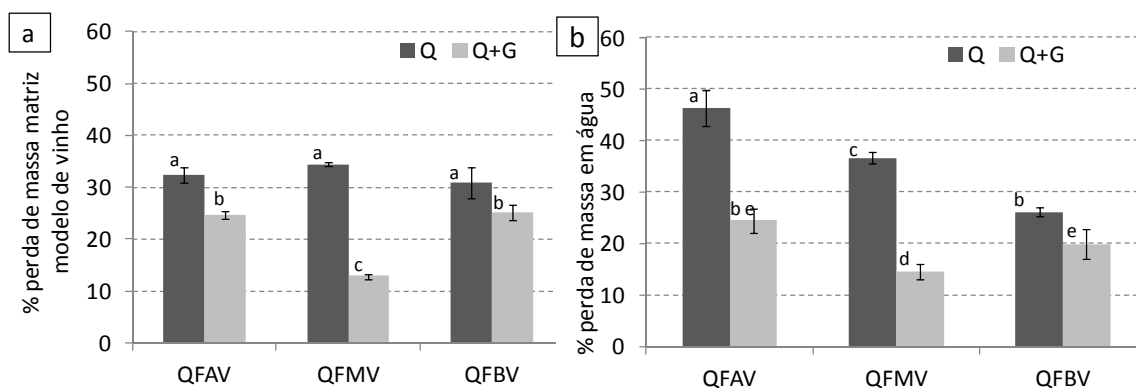


Figura 16 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q; 1,5 %) e quitosana com genipina (Q+G; 0,05 %) de alta (Q_{FAV}), média (Q_{FMV}) e baixa (Q_{FBV}) viscosidade numa matriz modelo de vinho ao fim de 15 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Comparando a solubilidade de todos os filmes, o que apresenta menor solubilidade em ambas as matrizes é o filme que foi preparado com quitosana de média viscosidade com adição de genipina (figura 16). Assim, apesar da atividade antioxidante ser maior para o filme de quitosana de baixa viscosidade, a sua solubilidade é 56 % superior à do filme de

quitosana de média viscosidade com genipina. A quitosana selecionada para preparar os filmes para os estudos seguintes foi a de média viscosidade devido à sua baixa solubilidade nas duas matrizes estudadas.

4.1.2 – Efeito da concentração de genipina

Estudos experimentais mostraram que o grau de reticulação pode variar com a concentração e o tempo de reação da genipina com a quitosana ^[86, 87]. Neste trabalho foram testadas duas concentrações de genipina, 0,05 e 0,1 % (m/v), para estudar o efeito da concentração de genipina na preparação de filmes de quitosana quanto à atividade antioxidante e à solubilidade.

Relativamente à atividade antioxidante, como se pode observar na figura 17, os filmes de quitosana preparados com diferentes concentrações de genipina apresentaram uma percentagem de inibição idêntica ($p < 0,05$).

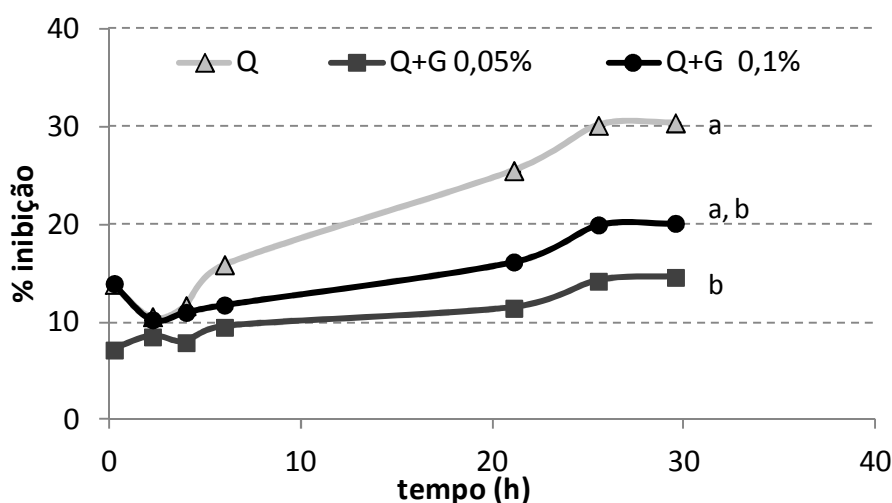


Figura 17 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes concentrações (0,05 e 0,1 %) de genipina (Q+G). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Ambos os filmes com quitosana e genipina dissolvem-se menos que os filmes de quitosana, em ambas as matrizes (figura 18), como já tinha sido observado anteriormente. Na matriz de vinho, ao fim de 15 dias, verifica-se que houve um aumento significativo da solubilidade com o aumento da concentração de genipina nos filmes (figura 18a). No entanto, na água ao fim de 15 dias as perdas de massa são iguais para os

filmes com adição de genipina (figura 18b). O aumento da solubilidade para os filmes com uma maior concentração de genipina pode dever-se ao facto do excesso de genipina passar para a solução em que está mergulhado, mas também pode ocorrer uma polimerização da genipina entre si uma vez que está em maior concentração na solução de quitosana, diminuindo a eficiência da reticulação ^[39].

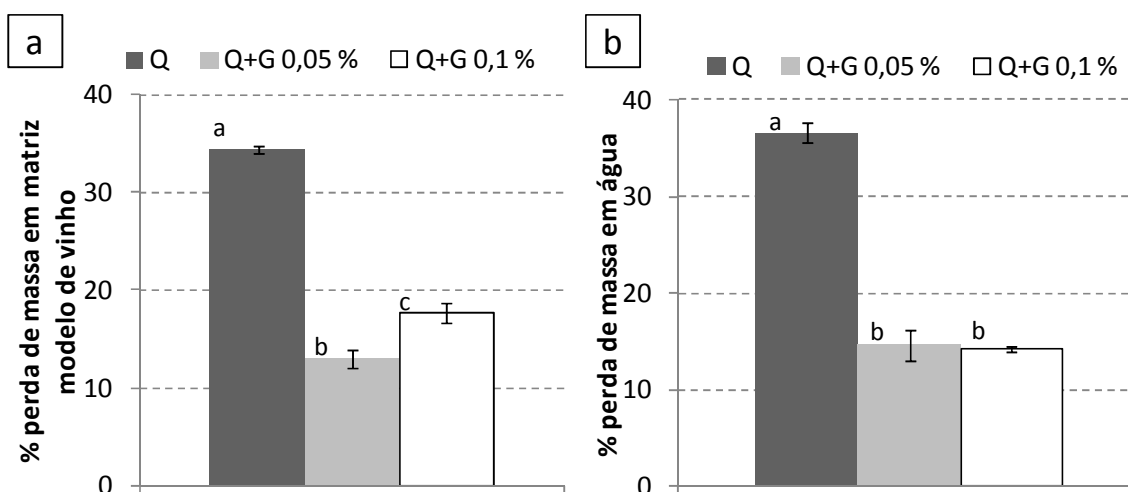


Figura 18 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q; 1,5 %) de média viscosidade com diferentes concentrações (0,05 e 0,1 %) de genipina (Q+G) na (a) matriz modelo de vinho e em (b) água ao fim de 15 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

Estes resultados mostram que o aumento da concentração de genipina de 0,05 % para 0,1% para este tipo de filmes de quitosana, em ambas as matrizes, não diminui a solubilidade dos filmes nem altera a sua atividade antioxidante. Assim, pode-se concluir que a utilização de 0,05 % de genipina na produção dos filmes é suficiente para diminuir a sua solubilidade em meio ácido.

4.1.3 – Tempo de reação da quitosana com a genipina

O estudo do tempo de reação de quitosana de média viscosidade com genipina (0,05 %) foi também realizado para averiguar qual a sua influência na atividade antioxidante e solubilidade dos filmes. Os tempos de reação estudados foram 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h; refira-se que o tempo de reação utilizado anteriormente na preparação dos filmes de quitosana com genipina foi de 2 h (pontos 4.2.1 e 4.2.2).

Verificou-se uma maior atividade antioxidante para os filmes de quitosana com adição de genipina ao fim de 6 h de reação (figura 19), sendo esta diferença apenas significativa para os filmes de quitosana e quitosana com genipina ao fim de 12 e 24 h de reação. A atividade antioxidante da genipina usada na preparação dos filmes foi determinada e foi obtida uma concentração de $0,116 \pm 0,002$ mM em equivalentes de trolox por g de genipina, confirmando que este composto tem atividade antioxidante, assim como, está descrito na literatura ^[35].

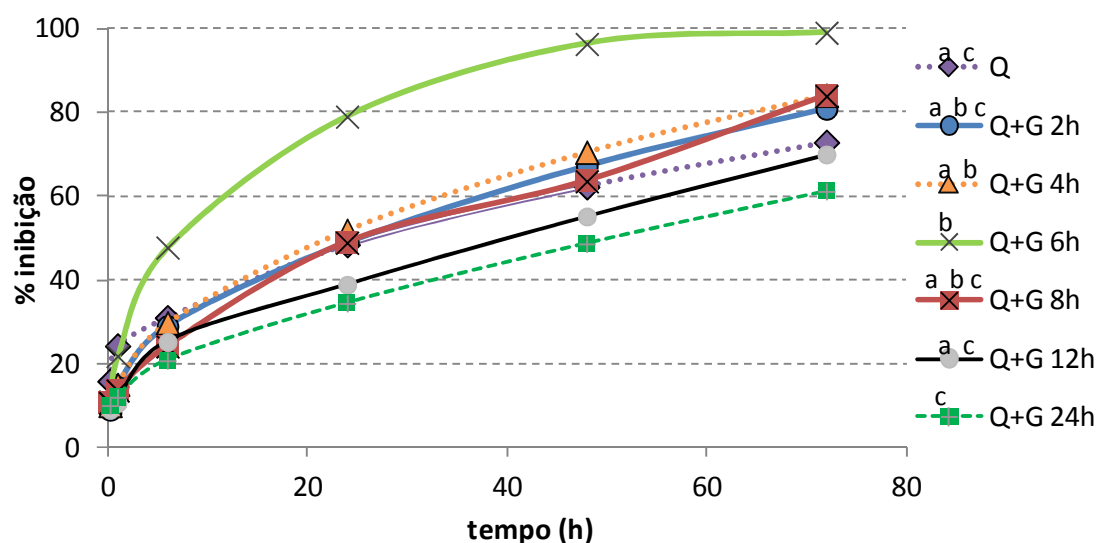


Figura 19 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes tempos de reação de genipina (Q+G). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

Os resultados da solubilidade ao fim de 7 dias para os filmes em que se variou o tempo de reação (2, 4, 6, 8, 12 e 24 h) estão apresentados na figura 20 para uma matriz modelo de vinho e para a água. A percentagem de massa perdida dos filmes é inferior a 15% para todos os filmes com adição de genipina, sendo inferior ao filme de quitosana (no mínimo, 22 %), tal como tinha sido verificado anteriormente. A solubilidade não é significativamente diferente para os filmes de 2, 4, 6, 8 e 12 h de reação. No entanto, o filme com um tempo de reação de 24 h tem uma solubilidade significativamente inferior a todos os outros filmes (figura 20a).

Em água a percentagem de massa perdida ao fim de 7 dias é inferior a 20 % para todos os filmes e a solubilidade não é significativamente diferente para os filmes de quitosana com



genipina com tempo de reação de 2, 4, 6, 8, 12 h e o filme de quitosana. O filme com menor percentagem de perda de massa é o de quitosana com genipina durante 24h de reação, apenas é igual para o filme com um tempo de reação de 8 h, tal como na matriz modelo de vinho.

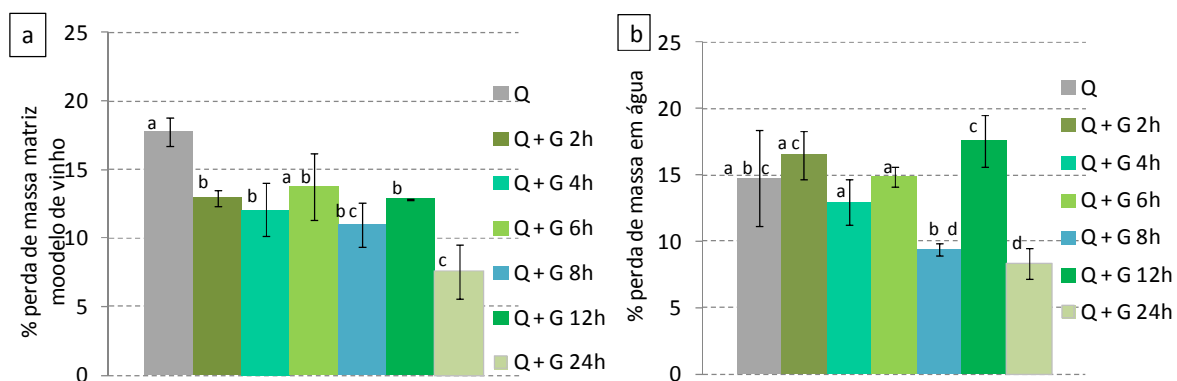


Figura 20 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) de média viscosidade com diferentes tempos de reação de genipina (Q+G) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água ao fim de 7 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$)

Na preparação dos filmes verificou-se o aumento da cor com o aumento do tempo de reação entre a quitosana e a genipina. Está descrito que as soluções de quitosana com genipina vão adquirindo uma cor azul cada vez mais intensa com o aumento do tempo de reação da quitosana à genipina. Este aumento da intensidade da cor segundo Mi *et al.*^[33] deve-se à ligação entre as aminas primárias da quitosana e a genipina. As redes tridimensionais formadas com a quitosana e a genipina apresentam a vantagem de ser insolúveis em soluções ácidas e alcalinas^[86]. No estudo do tempo de reação da quitosana com a genipina, verificou-se que o aumento do tempo de reação de 2 h para 24 h diminuiu a solubilidade dos filmes nas matrizes modelo de vinho (pH 3,5) e em água devido provavelmente ao aumento da reticulação da quitosana.

Após as análises efetuadas para os diferentes tempos de reação da quitosana com a genipina, comparando todos os filmes quanto à atividade antioxidante e solubilidade, o filme com maior atividade antioxidante foi o que reagiu durante 6 h, no entanto este é o que apresenta maior solubilidade em ambas as matrizes testadas. Assim como o objetivo principal é obter um filme insolúvel em soluções ácidas, o que apresentou melhores

resultados foi o obtido com um tempo de reação de 24 h, sendo este o tempo de reação selecionado para a preparação dos filmes.

4.1.4 – Quitosanas da Sigma e Fluka

Uma vez que a quitosana é um biopolímero natural e pode ser obtida de fontes e métodos diferentes, podendo influenciar as suas características^[8] e consequentemente as propriedades dos filmes. Assim, foram preparados filmes com quitosana de média viscosidade mas de duas marcas, Sigma e Fluka, para tentar perceber se existiam diferenças nas características finais dos filmes.

A solubilidade, ao fim de 15 dias, dos filmes preparados com tempos de reação de 24 h da quitosana com genipina está apresentada na figura 21 para matriz modelo de vinho e de água. A solubilidade dos filmes de quitosana da Fluka com genipina não apresentou percentagens de perda de massa significativamente diferentes na matriz modelo de vinho em relação aos preparados com quitosana da Sigma. No entanto, em água o filme com 24 h de reação da Sigma tem perdas de massa significativamente inferiores (5,6%) em relação ao da Fluka (11,5%). O filme com menor solubilidade foi preparado com quitosana da Sigma com genipina durante 24 horas de reação.

Esta experiência demonstra que variando apenas a marca da quitosana obtiveram-se filmes com solubilidades significativamente diferentes. No entanto, não foi possível saber quais as diferenças existentes entre as duas amostras, uma vez que não existia informação sobre a origem e o método de extração das duas quitosanas.

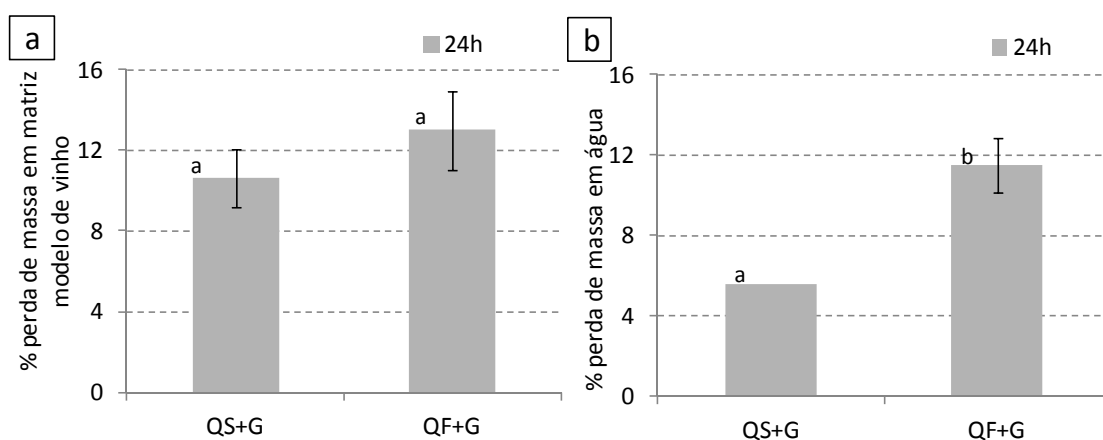


Figura 21 – Percentagens de perda de massa na (a) matriz modelo de vinho e (b) água ao fim de 15 dias para quitosana de média viscosidade da Fluka e da Sigma com 24 h de tempo de reação. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).



Em resumo, comparando todos os filmes, o filme selecionado foi o preparado com quitosana de média viscosidade da Sigma com adição de genipina 0,05 % e com tempo de reação de 24 horas.

4.2 – Preparação de filmes de quitosana com genipina e incorporação de *Aloe vera* ou oligoquitosanas

Com o objetivo de obter uma atividade antioxidante superior à dos filmes produzidos apenas com quitosana e genipina, a estes filmes foram incorporados compostos com atividade antioxidante elevada, um extrato de *Aloe vera* ou oligoquitosanas [9, 88]. A atividade antioxidante destes compostos foi determinada por dois métodos, o ABTS e FRAP, para confirmar o seu potencial para incrementar a atividade antioxidante dos filmes. Nos filmes preparados foi avaliada a sua atividade antioxidante e solubilidade.

Os resultados da atividade antioxidante estão apresentados na tabela 3, como se pode observar, a quitosana, o *Aloe vera*, e as oligoquitosanas possuem atividade antioxidante.

Tabela 3 – Atividade antioxidante da quitosana (Q_{SMV}), *Aloe vera* (A) e oligoquitosanas (OQs) por diferentes métodos espectrométricos, ABTS e FRAP.

Eq. Trolox (mM/g)	Métodos		
	Quitosana	<i>Aloe vera</i>	Oligoquitosanas
ABTS	$0,195 \pm 0,017^b$	$0,131 \pm 0,004^f$	$0,403 \pm 0,006^h$
FRAP	$0,120 \pm 0,018^c$	$0,088 \pm 0,003^g$	$0,300 \pm 0,008^i$

(letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Era esperado que a quitosana apresentasse atividade antioxidante por ambos os métodos, ABTS e FRAP, uma vez que, está descrito que a quitosana possuiu efeito quelante de iões metálicos, e por isso, pode ser considerada como um potencial antioxidante natural para estabilizar alimentos e prolongar o tempo de armazenamento [6]. Para as oligoquitosanas, os resultados são concordantes com os da literatura, já que as oligoquitosanas têm maior atividade antioxidante que a quitosana média viscosidade, devido ao grau de polimerização ser menor e os grupos reativos estarem mais livres para poder reduzir os radicais livres [4, 7].

O extrato de *Aloe vera* usado neste trabalho revelou uma atividade antioxidante inferior à quitosana. No entanto, um estudo realizado por Hu *et al.*^[89] que testou o extrato de *Aloe vera* nas mesmas quantidades (100 µg) que o butil hidroxitolueno (BHT) e o α-tocoferol, verifica que este apresentou maior atividade antioxidante que o BHT e o α-tocoferol.

4.2.1 – Filmes de quitosana com genipina e incorporação de *Aloe vera*

O *Aloe vera* é uma planta tropical e subtropical que foi usada durante séculos pelas suas propriedades medicinais e terapêuticas. O *Aloe vera* tem sido vastamente utilizado em diversas áreas devido as suas propriedades biológicas^[88]. Recentemente, existe um maior interesse no *Aloe vera* como um ingrediente funcional em alimentos (bebidas) e como um material para revestimentos comestíveis de frutas e legumes devido às suas propriedades, nomeadamente, antifúngica e antioxidante^[88, 90].

Neste estudo prepararam-se filmes de quitosana com genipina e um extrato em pó de *Aloe vera* com diferentes concentrações (0,125 e 0,25 % m/v). A atividade antioxidante dos filmes obtidos foi medida ao longo do tempo (figura 22). Os filmes com incorporação do extrato de *Aloe vera* apresentaram maior atividade antioxidante (82 % de inibição ao fim 24 h) quando comparados com os filmes de quitosana com genipina (14 % de inibição). A atividade antioxidante do filme apenas aumentou de 70 % para 82 % de inibição com o aumento da concentração do extrato de *Aloe vera* de 0,125 para 0,25%.

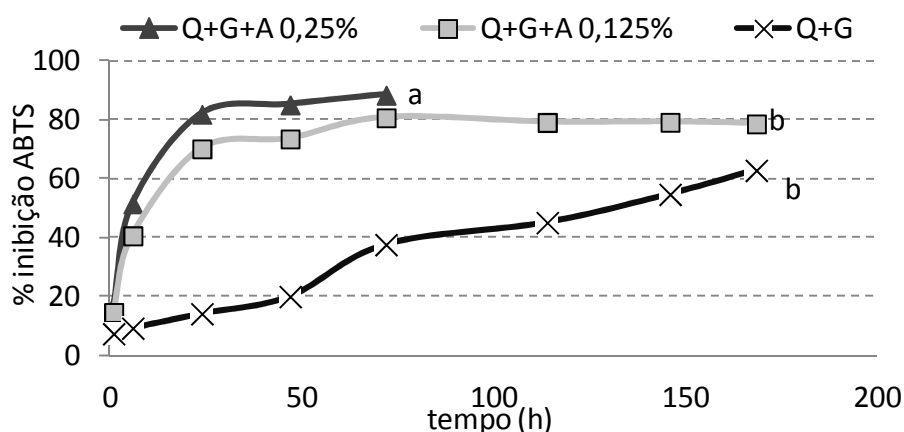


Figura 22 – Atividade antioxidante ao longo do tempo pelo método ABTS dos filmes de quitosana (Q) com genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de *Aloe vera* (A). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

A solubilidade dos filmes com incorporação de *Aloe vera* foi determinada nas duas matrizes, modelo de vinho e água (figura 23). Os resultados mostraram que os filmes com *Aloe vera* têm maior solubilidade (44 %) em ambas as matrizes em relação ao filme de quitosana com genipina. Este aumento da solubilidade pode ser devido ao extrato de *Aloe vera* não estar ligado covalentemente à estrutura da quitosana nem ficar aprisionado na rede formada pela quitosana e a genipina libertando-se para as soluções, mas também pode ser devido ao facto da sua presença impedir as ligações entre as moléculas de quitosana^[91].

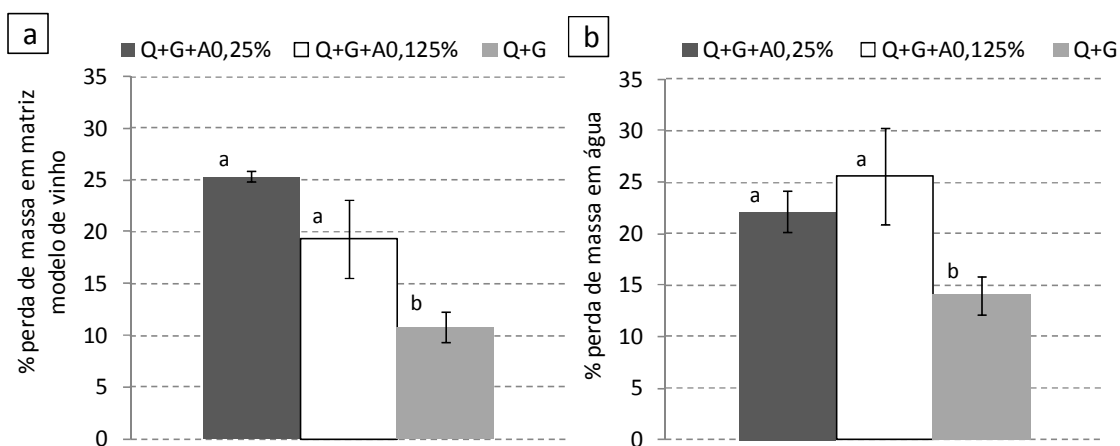


Figura 23 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) com genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de *Aloe vera* (A) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água durante 15 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

Os filmes com incorporação de *Aloe vera* apresentaram uma atividade antioxidante superior aos filmes de quitosana com genipina. No entanto, estes filmes têm uma solubilidade significativamente superior, em ambas as matrizes testadas, em relação aos filmes de quitosana com genipina. Devido à solubilidade, estes filmes, nesta fase, não são viáveis para ser aplicados em vinho, mas podem ter uma potencial aplicação como revestimentos de outros alimentos, uma vez que, está descrito que o uso de revestimentos edíveis de *Aloe vera* em gel mostram ser benéficos na prevenção das perdas de humidade e firmeza, no controlo da taxa respiratória e desenvolvimento da maturação, atraso na oxidação e redução da proliferação de microrganismos em frutos como cerejas e uvas de mesa^[44, 92].



4.2.2 – Filmes de quitosana e genipina e incorporação de oligoquitosanas

Filmes de quitosana com genipina foram também preparados com incorporação de oligoquitosanas com o objetivo de incrementar a sua atividade antioxidante. Foram testadas concentrações de oligoquitosanas a adicionar aos filmes 0,5, 1, 2 e 5 %. Essas tentativas permitiram concluir que não é viável utilizar uma concentração de extrato de oligoquitosanas superior a 0,5 % pois os filmes, após a evaporação do solvente, ficaram duros e quebradiços e difíceis de manusear. Com o intuito de obter um filme que fosse possível manusear adicionou-se mais glicerol (1,5 % m/v) aos filmes de oligoquitosanas para aumentar a sua flexibilidade. Referia-se que os filmes descritos anteriormente foram preparados com glicerol a uma concentração de 0,75 %.

A atividade antioxidante dos filmes obtidos foi medida ao longo do tempo (figura 24). Os filmes com incorporação de oligoquitosanas apresentaram maior atividade antioxidante (39 % de percentagem de inibição ao fim 200 h) quando comparados com os filmes de quitosana com genipina (22 % de percentagem de inibição). A atividade antioxidante do filme de quitosana com genipina e maior quantidade de glicerol (1,5 %) foi superior para o filme com e sem incorporação de oligoquitosanas, sendo 49 % superior ao fim de 200 h para o filme com incorporação de oligoquitosanas e 83 % superior ao fim de 46 h para o filme de quitosana com genipina. Assim, o filme que obteve maior atividade antioxidante foi o filme de quitosana com genipina e glicerol 1,5 % (93 % ao fim de 46 h).

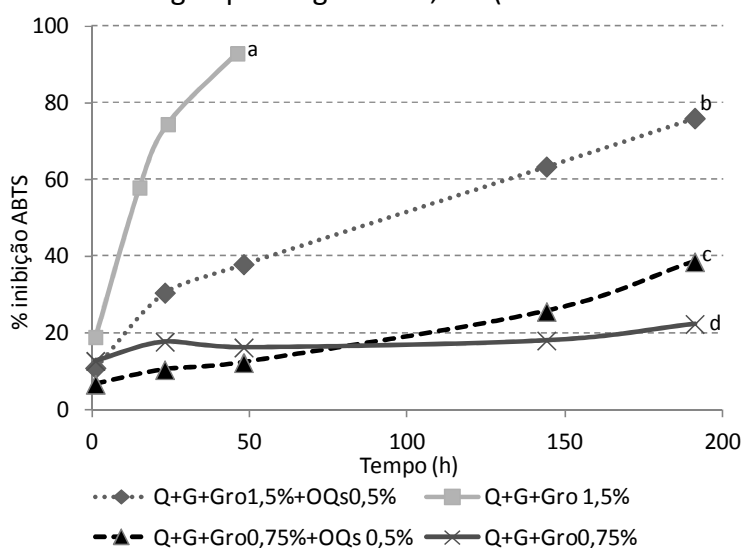


Figura 24 – Atividade antioxidante ao longo do tempo pelo método ABTS dos filmes de quitosana (Q) com adição de genipina (G) e incorporação de um extrato de oligoquitosanas (OQs). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).



Segundo Mourya *et al.*^[7] as oligoquitosanas, tal como a quitosana, têm atividade antioxidante, ou seja, capacidade de remover radicais livres, $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , radicais centrais de carbono e azoto, devido à sua capacidade para ceder átomos de hidrogénio e ao seu efeito quelante de metais. Anteriormente, foi determinada a atividade antioxidante para o extrato de oligoquitosanas utilizado e obteve-se uma concentração de 0,403 mM equivalentes de trolox por g de extrato de oligoquitosanas, 52% superior à atividade antioxidante da quitosana utilizada, 0,195 mM equivalentes de trolox por g de quitosana. Estes resultados suportam o aumento da atividade antioxidante nos filmes com incorporação de oligoquitosanas.

Relativamente ao efeito do glicerol não era esperado que os filmes apresentassem maior atividade antioxidante, uma vez que, não está descrito que os plastificantes possuam capacidade antioxidante.

A solubilidade dos filmes de quitosana com genipina e oligoquitosanas está apresentada na figura 25 para matriz modelo de vinho e água. Os filmes de oligoquitosanas 0,5 % com glicerol 0,75 % apresentam solubilidades 79 % superiores aos filmes de quitosana. Enquanto que, a solubilidade dos filmes de oligoquitosanas com uma concentração de glicerol 1,5 % apenas é 43 % superior aos filmes de quitosana. Os resultados mostraram que a solubilidade dos filmes de oligoquitosanas com glicerol 1,5 % é 46 % inferior aos filmes de quitosana de oligoquitosanas com glicerol 0,75 %, no entanto, estes filmes são mais solúveis que os filmes de quitosana. As oligoquitosanas, contrariamente à quitosana é solúvel em água devido ao comprimentos das suas cadeias serem curtos^[7], este facto pode explicar o aumento da solubilidade nos filmes com incorporação de oligoquitosanas. O aumento da concentração de glicerol de 0,75 % para 1,5 % nos filmes de quitosana com genipina não altera significativamente as solubilidades dos filmes, sendo inferior a 20 % em ambas as matrizes.

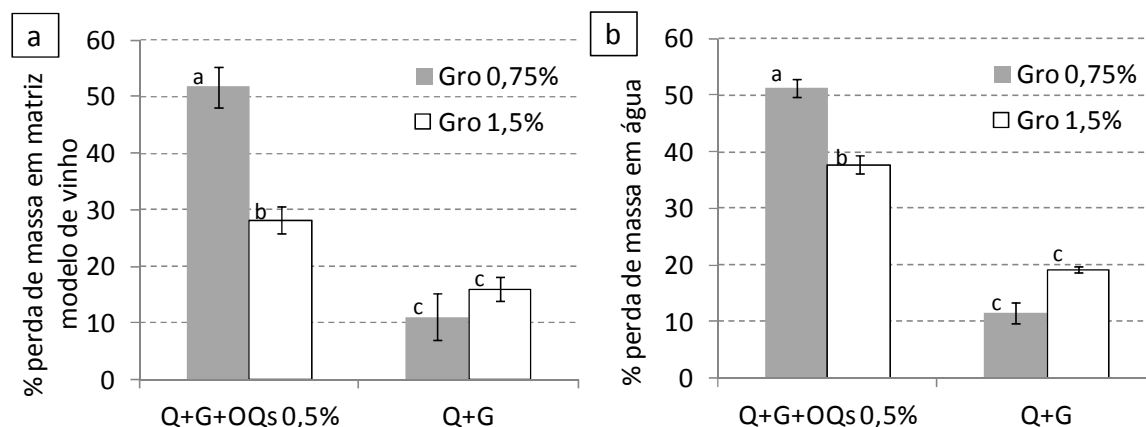


Figura 25 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) com adição de genipina (G) e incorporação de um extrato em pó de oligoquitosanas (OQs) na (a) matriz modelo de vinho e (b) água durante 7 dias. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Verificou-se que os filmes com incorporação de oligoquitosanas apresentam uma atividade antioxidante superior aos filmes de quitosana com genipina. No entanto, tal como os filmes com incorporação de *Aloe vera* tem solubilidades superiores, não sendo viáveis para a aplicação desejada, podem no entanto ser aplicados em outras matrizes. Surpreendentemente, neste estudo os filmes que apresentaram maior atividade antioxidante e menor solubilidade foram os filmes de quitosana com genipina e maior quantidade de glicerol 1,5 %.

4.3 – Estudo do efeito do plastificante

No ponto anterior verificou-se que os filmes de quitosana com maior concentração de glicerol apresentaram uma atividade antioxidante bastante superior não só aos filmes de quitosana com genipina, como também aos de quitosana com genipina e incorporação de oligoquitosanas. Não sendo conhecido qual a relação do plastificante e a atividade antioxidante, realizou-se o estudo do efeito do plastificante nos filmes de quitosana quanto à atividade antioxidante e à solubilidade.

Os plastificantes mais comuns utilizados na preparação de filmes edíveis são água, glicerol e sorbitol^[93]. O glicerol e o sorbitol são largamente usados como plastificantes por serem edíveis e devido à sua estabilidade. Por este motivo foram selecionados para estudar o efeito do plastificante nos filmes desenvolvidos neste trabalho.

Para estudar o efeito do plastificante nos filmes em relação à atividade antioxidante e à solubilidade prepararam-se filmes de quitosana e quitosana com genipina e diferentes concentrações de glicerol ou sorbitol (0,75, 1,5 e 2 %).

Na figura 26 está representada a atividade antioxidante dos filmes preparados com diferentes concentrações de glicerol. Os filmes com 1,5 % de glicerol têm maior atividade antioxidante que os filmes com 0,75 % de glicerol, tanto para os filmes de quitosana como para os filmes de quitosana com genipina. A atividade antioxidante aumentou 60 % com o aumento da concentração de glicerol de 0,75 % para 1,5 %. No entanto, o aumento do glicerol de 1,5 para 2% não alterou significativamente a atividade antioxidante dos filmes (figura 26). O filme de quitosana com genipina e 1,5% de glicerol apresentou maior atividade antioxidante em comparação com o mesmo filme sem genipina.

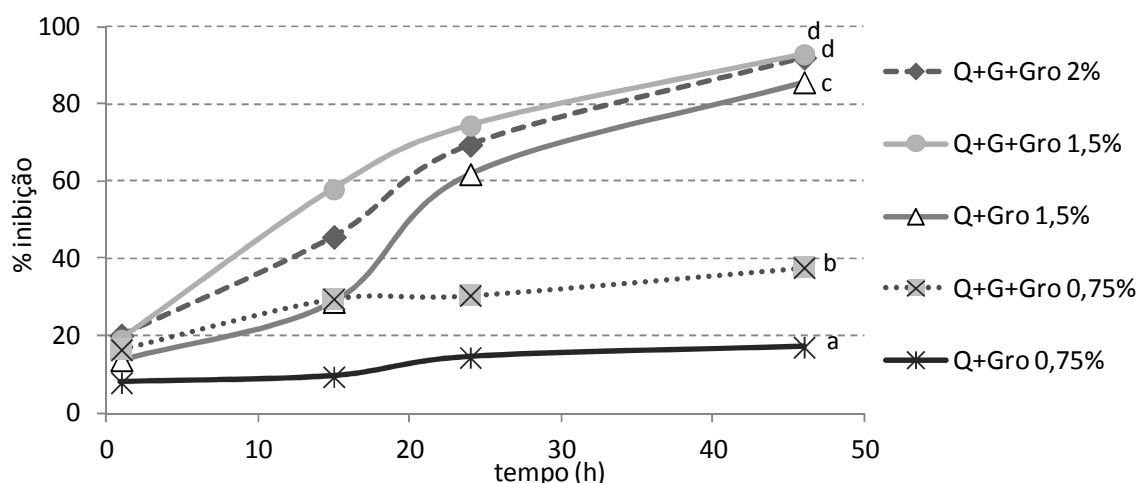


Figura 26 – Atividade antioxidante ao longo do tempo dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

As atividades antioxidantes dos filmes preparados com sorbitol estão apresentadas na figura 27. Os filmes preparados com quitosana e diferentes concentrações de sorbitol não apresentam valores significativamente diferentes (26 %), enquanto que, a atividade antioxidante dos filmes de quitosana com genipina e sorbitol diminui 28 % com o aumento da quantidade de sorbitol de 0,75 para 2 %. O filme com maior atividade antioxidante é o de quitosana com genipina e sorbitol 0,75 % que apresentou um valor 52 % superior ao filme de quitosana com 0,75 % de sorbitol. Na atividade antioxidante dos



filmes preparados com sorbitol não se verifica a mesma tendência dos filmes preparados com glicerol, pelo contrário, com o aumento da concentração de sorbitol ocorre uma diminuição na atividade antioxidante como se pode observar pela figura 27.

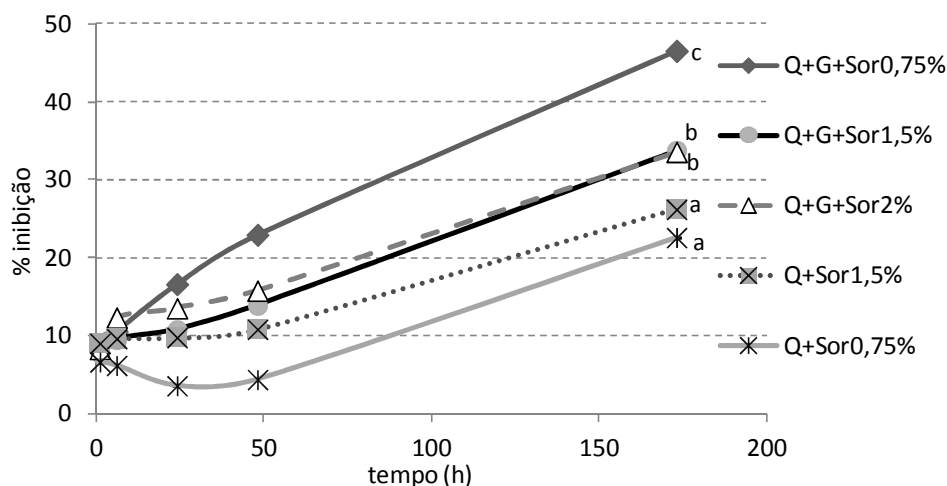


Figura 27 – Atividade antioxidante ao longo do tempo dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de sorbitol (Sor). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Os plastificantes utilizados não possuem efeito antioxidante, uma vez que, foi testada a sua atividade antioxidante utilizando duas metodologias (ABTS e FRAP) e verificou-se que eles não têm capacidade de captar radicais livres quer por cedência de átomos de hidrogénio quer por transferência de eletrões. Assim, a razão para o aumento da atividade antioxidante dos filmes com maior quantidade de glicerol não se deve ao facto deste ser antioxidante. Eventualmente, o aumento da atividade antioxidante nos filmes pode estar relacionado com o aumento no espaçamento entre as cadeias de quitosana e a disponibilidade dos grupos desta para captar os radicais livres.

Os resultados obtidos para a solubilidade dos filmes de quitosana e quitosana com genipina preparados com diferentes concentrações de glicerol e sorbitol têm a mesma tendência em ambas as matrizes (figura 28 e 29). Ao fim de 7 dias, os filmes com menor perda de massa foram os filmes preparados com glicerol, em que se observou que a solubilidade diminuía com o aumento da concentração de glicerol de 0,75 para 2 %. Esta diminuição pode estar relacionada com o carácter hidrofóbico dos filmes com o

plastificante ^[91]. No entanto, nos filmes com sorbitol verifica-se o oposto, pois existe um aumento da solubilidade com o aumento da concentração de sorbitol de 0,75 a 2 % nos filmes de quitosana com genipina. Os filmes de quitosana dissolveram-se para ambas as concentrações de sorbitol (figura 28 e 29). O filme que apresentou menor solubilidade foi o de quitosana com genipina e glicerol 2 % em ambas as matrizes.

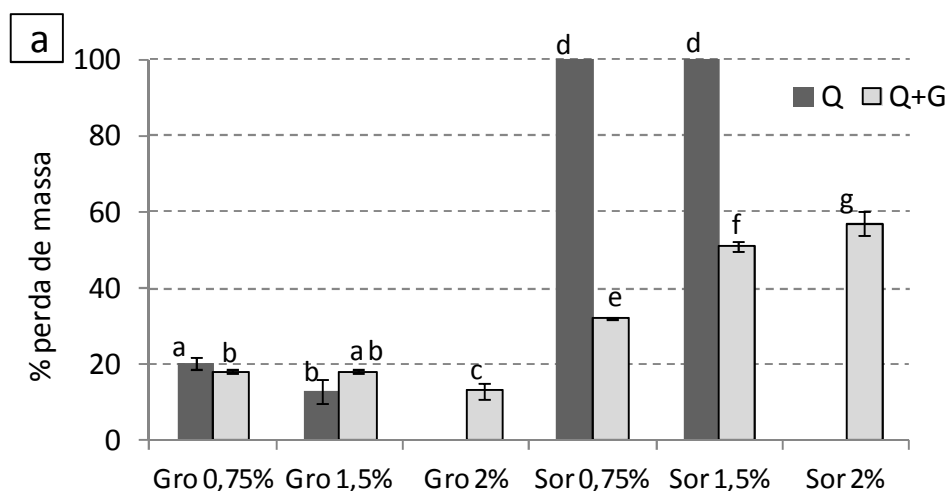


Figura 28 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) e sorbitol (Sor) durante 7 dias numa solução modelo de vinho. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

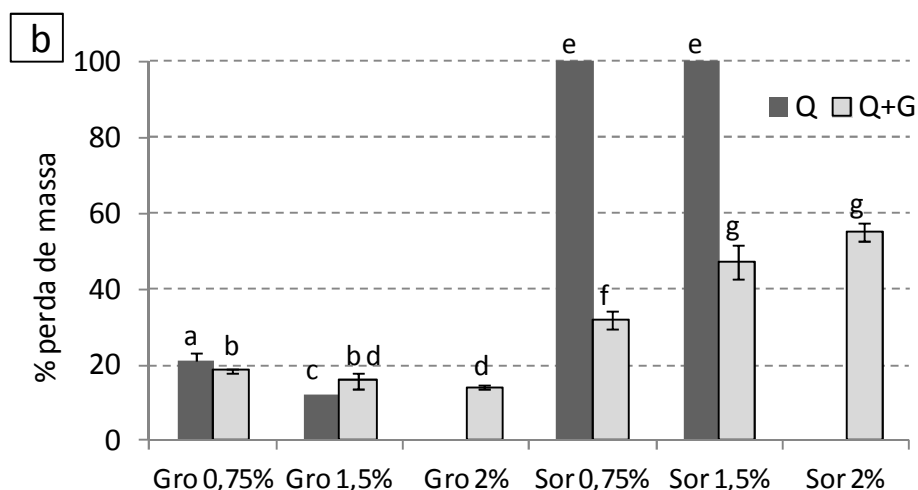


Figura 29 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana (Q) e quitosana com genipina (G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) e sorbitol (Sor) durante 7 dias em água. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Os filmes de quitosana com genipina e glicerol 1,5 e 2 % apresentaram as características mais atrativas, ou seja, melhor atividade antioxidante e menor solubilidade. Além disto,



está descrito que o uso deste plastificante diminui a deterioração à superfície do filme formado, enquanto exerce também um efeito protetor durante o armazenamento em comparação com o filme de quitosana sem adição de glicerol ^[94].

4.4 – Caracterização dos filmes selecionados

Para os filmes de quitosana com genipina (0,05 %) e glicerol (1,5 %) que revelaram possuir as melhores propriedades de acordo com o que era pretendido, nomeadamente elevada atividade antioxidante e insolubilidade em meio ácido, prepararam-se novos filmes e procedeu-se a uma caracterização mais exaustiva quanto à sua atividade antioxidante, solubilidade, propriedades mecânicas e ângulos de contacto.

4.4.1 – Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos filmes selecionados, quitosana com genipina (0,05 %) e glicerol (1,5 %), foi estudada usando diferentes metodologias, nomeadamente o ABTS, o DPPH e o FRAP. A atividade antioxidante foi avaliada em sistemas químicos contra radicais que não existem nos sistemas biológicos como o ABTS e o DPPH, ambos os métodos são radicalares e com um mecanismo semelhante. Refira-se que o método de ABTS foi o utilizado anteriormente para determinar a atividade antioxidante dos filmes durante todo o processo de otimização.

A análise da atividade antioxidante pelo método ABTS permitiu comprovar que o filme de quitosana com genipina e glicerol 1,5 %, é o que apresenta maior percentagem de inibição, 93 % ao fim de 48h (figura 30a).

Pelo método do DPPH obteve-se a mesma tendência na atividade antioxidante que tinha sido obtida para o ABTS. A percentagem de inibição dos filmes aumentou com o aumento da concentração do glicerol (figura 30b), o filme de quitosana com genipina e glicerol 1,5% teve uma atividade antioxidante 64 % superior aos filmes de quitosana com genipina e glicerol 0,75% e 98 % superior aos de quitosana com genipina sem glicerol.

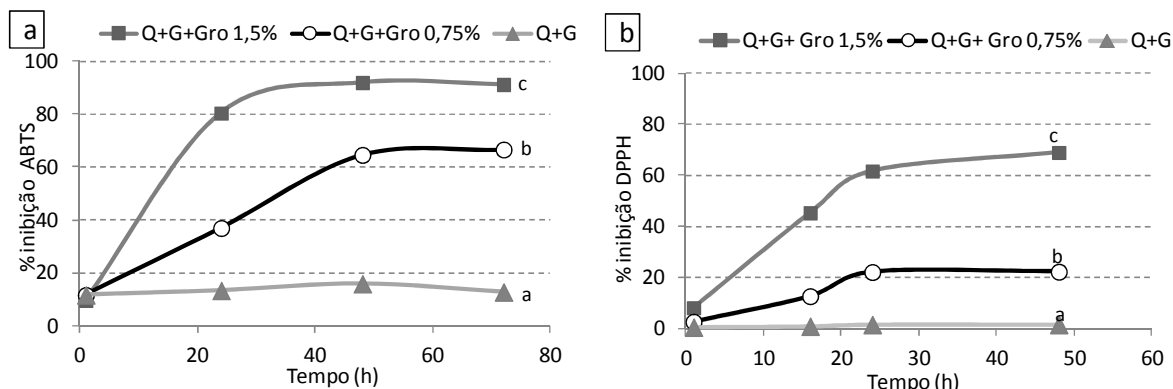


Figura 30 – Atividade antioxidante ao longo do tempo de filmes de quitosana com genipina (Q+G), pelo método de radicais livres (a) ABTS e (b) DPPH. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

No método do FRAP os resultados obtidos mostram que o filme de quitosana com genipina sem adição de glicerol é o que tem maior atividade antioxidante (figura 31). Estes filmes apresentam uma atividade antioxidante significativamente superior de 35 e 51 % em relação aos filmes de quitosana com genipina e glicerol 0,75% e 1,5%, respetivamente. Na atividade antioxidante dos filmes pelo método de FRAP não se verifica a mesma tendência observada pelo método de ABTS e do DPPH, pelo contrário, com o aumento da concentração de glicerol parece ocorrer uma diminuição na atividade antioxidante (figura 31).

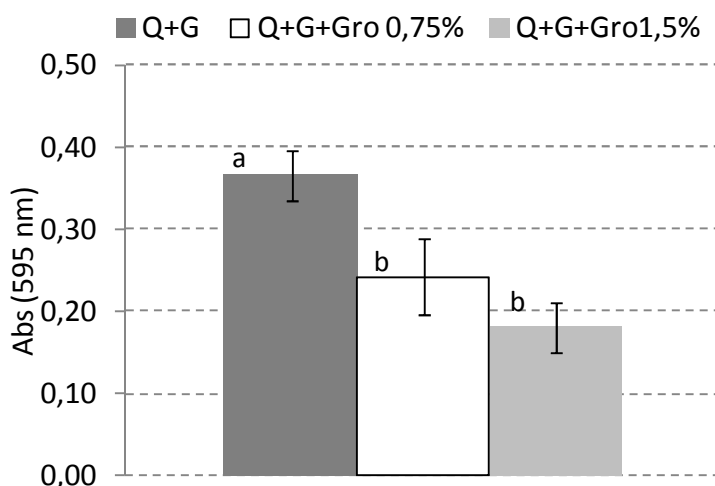


Figura 31 – Atividade antioxidante de filmes de quitosana (Q) e quitosana com adição de genipina (Q+G) pelo método do FRAP ao fim de 60 minutos. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).



No método do ABTS, a formação de um radical monocatião de ABTS^{•+} é obtida pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio, este é reduzido na presença de antioxidantes dadores de hidrogénio ^[57]. No teste do DPPH, tal como no ABTS, acontece uma redução dos radicais livres, o antioxidante reduz o radical de DPPH para um composto com uma cor amarela, difenilpicrilhidrazina, e a extensão da reação depende da capacidade para doar átomos de hidrogénio pelo antioxidante ^[60]. No entanto, o método de FRAP é baseado na capacidade de redução do íão ferro, (Fe(III)-TPTZ) a Fe(II)-TPTZ ^[59]. Uma desvantagem do método de FRAP é a de poderem ocorrer reações simultâneas na determinação da atividade antioxidante. As interferências podem ser causadas por compostos com efeito quelante, como é o caso da quitosana, que se ligam ao Fe (III) e formam complexos, reduzindo a quantificação pelo método de FRAP ^[58, 59]. Este pode ser o motivo pelo qual se observou uma menor atividade antioxidante no filme de quitosana com genipina e glicerol 1,5 % quantificada pelo método do FRAP em relação ao ABTS e DPPH, pois neste filme a quitosana pode estar mais disponível para se poder ligar ao Fe (III) reduzindo a quantificação por este método.

O filme que apresentou melhor atividade antioxidante radicalar, por ambos os métodos ABTS e DPPH, foi o de quitosana com genipina e glicerol 1,5 %. O método de FRAP não é o adequado para avaliar este sistema devido a poderem estar a acontecer interferências por parte da quitosana na determinação da atividade antioxidante.

4.4.2 – Solubilidade

A solubilidade dos filmes de quitosana com genipina (0,05 %) e glicerol (1,5 %) foi determinada em solução modelo de vinho e em água para comprovar os resultados obtidos anteriormente (Figura 32). A solubilidade dos filmes de quitosana com genipina e glicerol é significativamente inferior à solubilidade dos filmes de quitosana com genipina (figura 32). A solubilidade dos filmes com glicerol não é significativamente diferente com o aumento da concentração de glicerol de 0,75 % para 1,5 % ($p < 0,05$).

A solubilidade dos filmes com glicerol não é significativamente diferente com o aumento da concentração de glicerol de 0,75 % para 1,5 %, comprovando o que se tinha verificado anteriormente.

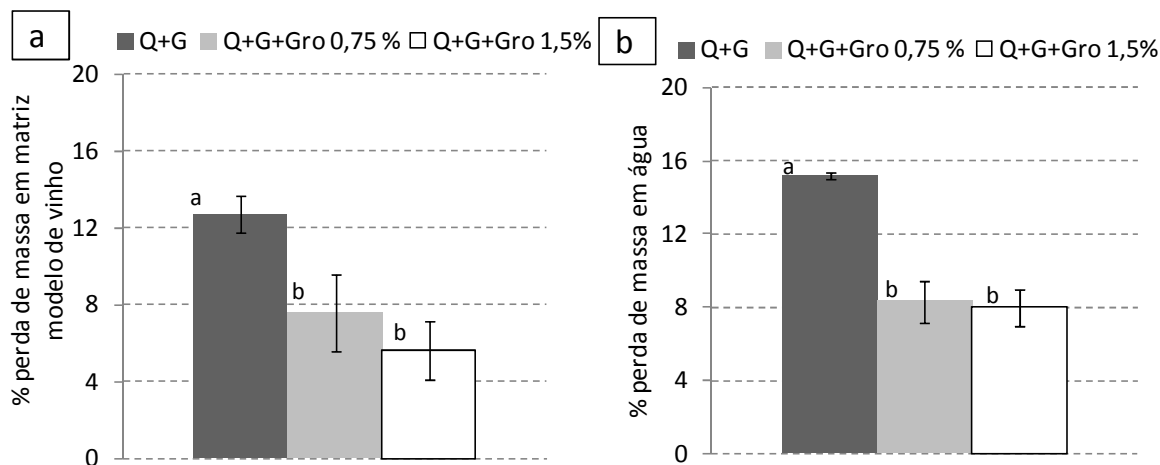


Figura 32 – Percentagem de perda de massa dos filmes de quitosana com genipina (Q+G) para diferentes concentrações de glicerol (Gro) durante 7 dias na (a) matriz modelo de vinho e em (b) água. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n = 3$).

4.4.3 – Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes selecionados foram estudadas por ensaios de tensão uniaxial até à rutura. Os filmes foram submetidos a uma deformação crescente, com uma área de contacto que variou entre $0,3 - 0,6 \text{ mm}^2$. Os filmes de quitosana sem adição de plastificante tinham uma espessura menor $0,3 \text{ mm}^2$. Os filmes de quitosana com genipina e glicerol (0,75 %) apresentavam uma espessura média de $0,37 \text{ mm}^2$ e os filmes de quitosana com genipina e glicerol 1,5 % de $0,54 \text{ mm}^2$. Na figura 33 estão exemplificadas as curvas de tensão em função da deformação dos três tipos de filmes analisados, filme de quitosana com genipina e filme de quitosana com genipina e glicerol 0,75 e 1,5 %.

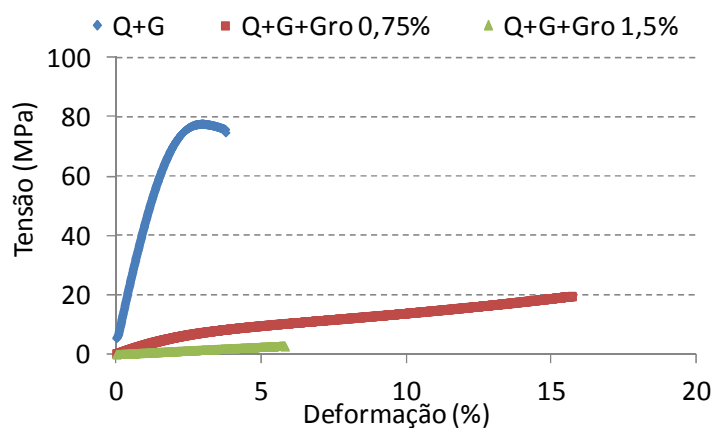


Figura 33 – Curvas de tensão em função da deformação, correspondentes a filmes de quitosana com genipina (Q+G), quitosana com genipina e glicerol (Q+G+Gro) 0,75 % e 1,5 %.



A partir dos ensaios de tensão realizados obtiveram-se curvas de tensão em função da deformação das quais se determinaram os seguintes parâmetros mecânicos: tensão no ponto de rutura, módulo de Young e taxa de deformação no ponto de rutura (tabela 4).

A adição de uma quantidade crescente de plastificante ao filme de quitosana provocou a diminuição da tensão no ponto de rutura de 77 para 20 MPa e do módulo de Young de 41 para 3 MPa. Enquanto que, a taxa de deformação para o filme de quitosana com uma concentração de glicerol de 0,75 % aumentou de 4,7 para 15,8 % em relação ao filme de quitosana com genipina sem glicerol.

Para a concentração de 1,5 % de glicerol verifica-se uma diminuição drástica na tensão de rutura (96 %), na taxa de deformação (80 %) e no módulo de Young (99 %) em relação ao filme de quitosana com genipina sem glicerol.

Tabela 4 – Propriedades mecânicas obtidas de curvas de tensão – deformação para os filmes de quitosana com genipina e diferentes proporções de glicerol.

	Tensão de rutura (MPa)		Deformação (%)		Módulo de Young (MPa)	
Q+G	77,08	± 5,53 ^a	4,68	± 1,09 ^a	41,24	± 4,43 ^a
Q+G+Gro 0,75%	20,28	± 2,99 ^b	15,78	± 2,00 ^b	3,10	± 0,22 ^b
Q+G+Gro 1,5%	2,96	± 0,98 ^c	5,81	± 1,54 ^a	0,52	± 0,03 ^c

(letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=6$).

Neste trabalho, o uso da concentração de glicerol 0,75 % aumentou a flexibilidade dos filmes de quitosana com genipina. Este facto pode ser devido à adição de um plastificante diminuir a rigidez do polímero por redução as forças intermoleculares. As moléculas do plastificante colocam-se entre as cadeias do polímero aumentando a mobilidade entre estas, ou seja, o plastificante aumenta a flexibilidade e reduz a fragilidade do polímero^[95]. O módulo de Young também diminui com adição do plastificante o que significa que a dureza intrínseca dos filmes de quitosana diminui à medida que a concentração de plastificante aumenta.

Segundo Arvanitoyannis *et al.*^[46], que usou sorbitol e sacarose como plastificante para misturas de filmes de quitosana com álcool polivinílico, concluiu que a deformação das misturas aumentava com a concentração de plastificante, mas para concentrações altas de plastificante diminuía drasticamente tanto a força de tensão como o módulo de



Young. Segundo Suyatma *et al.*^[51] que testou quatro plastificantes diferentes, nomeadamente, glicerol, etilenoglicol, polietilenoglicol e propilenoglicol em filmes de quitosana, quanto à sua hidrofiliidade e à sua estabilidade durante o armazenamento, conclui que os plastificantes melhoram a ductibilidade da quitosana, embora na maioria dos casos diminua com o armazenamento.

Neste trabalho todos os filmes preparados estavam em condições de ser manuseados e colocados nas garrafas de vinho, no entanto, para outras aplicações como revestimento de alimentos, os filmes de quitosana com genipina e glicerol 1,5 % podem não ser adequados devido à sua baixa tensão de rutura e taxa de deformação. Os filmes com melhor taxa de deformação são os filmes de quitosana com genipina e glicerol 0,75 %.

4.4.4 – Ângulo de contacto

Procedeu-se à determinação do ângulo de contacto, usando a água como solvente, com o objetivo de verificar a afinidade existente entre a superfície dos filmes e a água. Na tabela 5 estão representados os resultados obtidos para os diferentes filmes de quitosana com genipina e glicerol.

O filme de quitosana com genipina sem glicerol tem um ângulo de contacto de 86° enquanto o filme de quitosana com genipina e glicerol 0,75% obteve um ângulo de contacto de 81° e o filme de quitosana com genipina e glicerol 1,5% de 77°. Estes resultados demonstram que os ângulos de contacto obtidos para os filmes preparados diminuem com o aumento da concentração de glicerol adicionado ao filme de quitosana.

Tabela 5 - Ângulo de contacto (usando água como solvente) da superfície dos filmes de quitosana com genipina e diferentes proporções de glicerol.

	Ângulo de Contacto (°)
Q+G	86,38 ± 0,95 ^a
Q+G+Gro 0,75%	81,02 ± 3,41 ^b
Q+G+Gro 1,5%	77,15 ± 1,48 ^c

(letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=9$).

Nesta técnica foi colocada uma gota de líquido na superfície do filme sobre o qual se pretendia conhecer a natureza hidrofílica. Quando a gota entra em contacto com a



superfície, estabelecem-se interações intermoleculares entre a superfície sólida e o líquido que podem ser forças atrativas ou repulsivas. É de salientar que quanto maior for o ângulo de contacto menor é a afinidade da superfície em questão para a água, ou seja, mais hidrofóbica será a superfície ^[86]. Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o aumento da concentração de glicerol provocou uma diminuição da hidrofilicidade da superfície do filme. Estes resultados estão de acordo com o que está descrito na literatura em que os plastificantes aumentam a hidrofobicidade dos filmes ^[51]. Existe um estudo em que incorporaram óleo de tomilho em filmes de base de quitosana e verificaram que a diminuição da solubilidade do filme estava relacionada com o aumento da hidrofobicidade da superfície do filme ^[91]. Este aumento da hidrofobicidade dos filmes com o aumento da concentração de glicerol pode justificar a diminuição da solubilidade destes filmes.

4.5 – Aplicação dos filmes de quitosana com genipina na conservação do vinho

Neste trabalho foi necessário otimizar as condições para produzir um filme que fosse capaz de conservar um vinho sem adição de dióxido de enxofre sem alterar as suas propriedades físico-químicas e sensoriais. Com o intuito de testar a aplicação de filmes à base de quitosana durante a vinificação, os filmes com maior potencial foram usados na vinificação de 2010. Nessa altura, os filmes preparados com melhor atividade antioxidante e menos insolúveis em meio ácido eram os filmes de quitosana de média viscosidade (sigma) com genipina (0,05 %; 24 h de tempo de reação) e glicerol (0,75 %). Por isso, estes foram os filmes utilizados para adicionar ao vinho para avaliar a sua eficiência.

Dois tipos de vinho foram utilizados, um vinho tinto mono casta Touriga Nacional (T) e vinho branco mono casta Encruzado (B). Vinhos tinto e branco com 40 mg/L de dióxido de enxofre (SO₂) e sem SO₂ (0 mg/L) foram também analisados ao longo do armazenamento para comparar com as amostras de vinho em que os filmes de quitosana foram adicionados. Os 40 mg/L de SO₂ correspondem à concentração utilizada na indústria dos vinhos para se obter um vinho pronto para comercializar, tanto a nível microbiológico como a nível de estabilidade físico-química.



Com o objetivo de avaliar a influência dos filmes de quitosana nas características físico-químicas do vinho, este foi analisado ao longo do tempo de armazenamento em termos de atividade antioxidante, conteúdo em compostos fenólicos e taninos totais, a cor (intensidade, tonalidade, CIElab), o crescimento microbiológico (bactérias e leveduras) e propriedades sensoriais.

4.5.1 – Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos vinhos foi analisada na altura em que se mergulharam os filmes no vinho e ao fim de 2 e 8 meses de armazenamento (figura 34). A atividade antioxidante das amostras de vinho tinto com 40 mg/L de SO₂ aumenta ligeiramente ao longo do armazenamento, apresentando uma atividade antioxidante de 15 mM equivalentes de trolox ao fim de 8 meses de armazenamento. As amostras de vinho sem adição de SO₂ têm uma atividade antioxidante 38 % inferior em relação ao vinho com 40 mg/L de SO₂ ao fim dos 8 meses. No caso das amostras de vinho tinto em que filmes de quitosana estiveram mergulhados, a atividade antioxidante diminuiu 36 % ao fim de 8 meses e 26 % em relação ao vinho com 40 mg/L de SO₂. Apesar da atividade antioxidante do vinho com filmes de quitosana ter diminuído ao longo do armazenamento em relação ao vinho com 40 mg/L de SO₂ foi 15 % superior à do vinho sem SO₂.

A atividade antioxidante para o vinho branco nas amostras de vinho com 40 mg/L de SO₂ manteve-se constante ao longo do tempo (1,8 mM equivalentes de trolox). Nas amostras de vinho sem adição de SO₂ e com filmes de quitosana verificou-se um aumento da atividade antioxidante dos 2 para os 8 meses de 19 % e 18 %, respetivamente. Ao fim de 8 meses, a atividade antioxidante para as amostras de vinho sem adição de SO₂ e com filmes de quitosana são iguais e superiores às amostras de vinho 40 mg/L de SO₂ (26 % e 18 %, respetivamente), como se pode observar na figura 34.

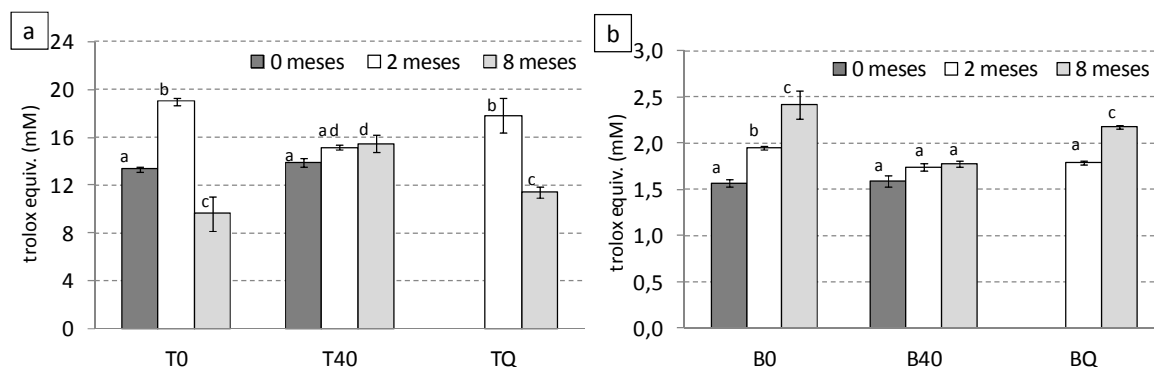


Figura 34 – Atividade antioxidante das amostras de (a) vinho tinto (T) e (b) branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q) ao longo do tempo. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

A atividade antioxidante dos vinhos com filmes de quitosana diminui ao longo do armazenamento para o vinho tinto e aumenta para o vinho branco. No vinho branco a atividade antioxidante é superior ao vinho com 40 mg/L de SO_2 , enquanto que no vinho tinto é inferior.

4.5.2 – Compostos fenólicos totais

Analizou-se os compostos fenólicos totais dos vinhos tinto e branco quando se mergulharam os filmes e ao fim de 2 e 8 meses de armazenamento (figura 35). Os resultados mostram que o vinho branco tem menor quantidade de compostos fenólicos que o vinho tinto, tal como descrito por Sanchez-Moreno *et al.*^[96].

Todas as amostras de vinho tinto apresentaram uma quantidade de fenóis totais idêntica ao fim de oito meses de armazenamento (figura 35). A análise para as amostras de vinho branco revelaram o mesmo comportamento que as do vinho tinto, isto é, a quantidade de compostos fenólicos é constante ao longo do armazenamento como se pode verificar pela figura 35. As amostras de vinho branco com filmes de quitosana apresentaram uma diminuição de 18 % na quantidade de fenóis totais em relação às amostras de vinho branco com 40 mg/L de SO_2 ao fim de 8 meses de armazenamento.

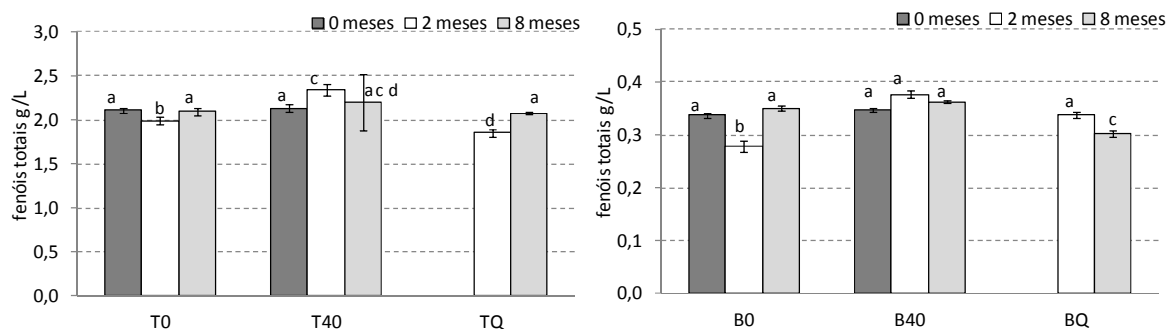


Figura 35 – Compostos fenólicos totais das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q) ao longo do armazenamento. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Os compostos fenólicos no vinho são importantes tanto para o vinho tinto como para o vinho branco. Estes são responsáveis por várias propriedades organoléticas do vinho, particularmente para a cor (e.g. antocianinas) e para as sensações gustativas, nomeadamente ao nível da adstringência e do amargor (e.g. ácidos fenólicos e flavanóis). Nos vinhos brancos é indesejável uma grande quantidade de compostos fenólicos, uma vez que contribuem para o amargor do vinho. Os compostos fenólicos presentes no vinho branco em maior quantidade são os ácidos fenólicos, os flavonóides e os estilbenos. No vinho tinto, as antocianinas constituem um grupo importante de compostos fenólicos responsáveis pela sua cor vermelha^[76]. As antocianinas e os taninos em particular, são os principais constituintes dos vinhos implicados em fenómenos de oxidação, que se traduzem por alterações de cor (acastanhamento) e por uma evolução do gosto (perda ou aumento da adstringência). A atividade antioxidante do vinho normalmente está associada à quantidade de compostos fenólicos, uma vez que, os compostos fenólicos têm a capacidade de inibir ou neutralizar radicais livres, fazer com que um átomo de hidrogénio de um grupo hidroxilo aromático possa ser doado a um radical livre ou a capacidade do composto aromático suportar um eletrão desemparelhado por deslocalização eletrónica^[76]. As análises efetuadas ao vinho não demonstram uma correlação entre a atividade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos totais, nas amostras de vinho tinto sem adição SO_2 ou com filmes de quitosana, a quantidade dos compostos fenólicos é constante, enquanto, a atividade antioxidante diminui. Assim

como, nas amostras de vinho branco com filmes de quitosana, a quantidade de compostos fenólicos totais diminui e a atividade antioxidante aumenta.

4.5.3 – Taninos totais

Os taninos totais foram determinados no vinho tinto sem SO₂, com 40 mg/L de SO₂ e com filme de quitosana com genipina após 8 meses de armazenamento. O vinho tinto com 40 mg/L de SO₂ apresenta 3,2 g/L de taninos totais, ao fim de oito meses, como se pode verificar na figura 36. O vinho sem SO₂ ou com filmes de quitosana têm uma concentração de taninos totais 34 e 46 % inferior, respetivamente, em relação ao vinho com SO₂.

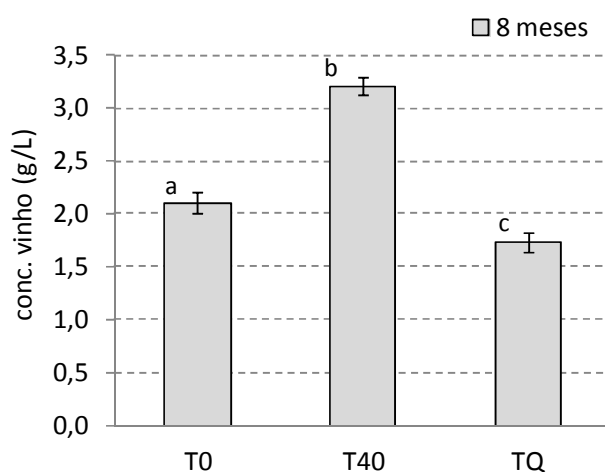


Figura 36 – Valores de taninos totais das amostras de vinho tinto (T) sem adição de SO₂ (0), com adição de SO₂ 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (A). (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

Esta análise baseia-se na reação de decomposição dos taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas) que são compostos sem cor e, que em meio ácido e por ação do calor, libertam compostos corados, as antocianidinas. A quantidade de procianidinas e prodelfinidinas diminuíram no vinho tinto sem adição de SO₂ e com filmes de quitosana em relação ao vinho com 40 mg/L de SO₂, o que significa que estão a ocorrer reações de polimerização. A M_M média dos taninos aumenta com o envelhecimento dos vinhos^[68]. Durante a conservação e o envelhecimento dos vinhos as modificações no estado de condensação dos taninos influenciam a sua cor e as suas

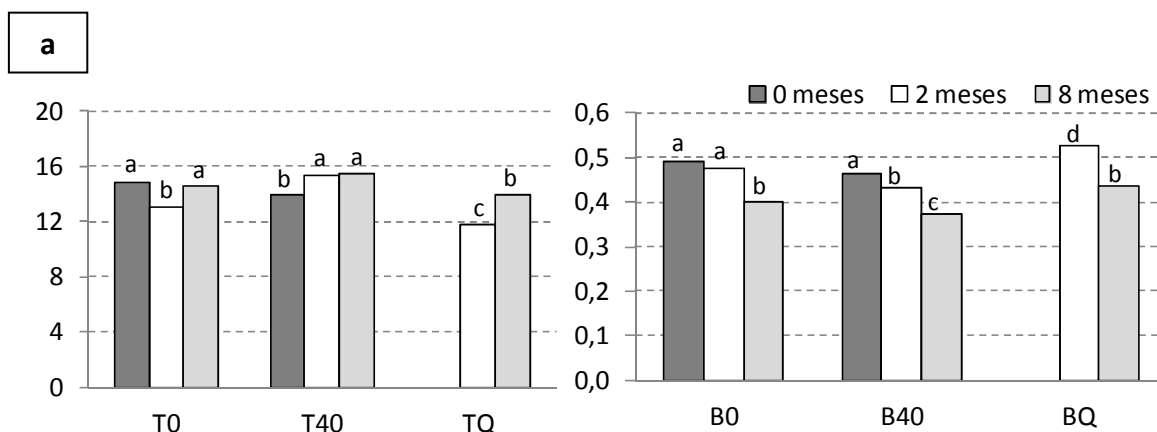


características organoléticas ^[68]. Assim, espera-se que tanto a cor como as características organoléticas do vinho tinto com filmes de quitosana tenha sofrido alterações ao fim de 8 meses.

4.5.4 – Cor

Para a medição da cor dos vinhos foram usados dois métodos espectrofotométricos. No primeiro método, as características cromáticas são expressas pela intensidade e pela tonalidade determinadas pelas absorvâncias a 420, 520 e 620 nm (figura 37). O vinho tinto sem adição de SO₂ e o vinho tinto com 40 mg/L de SO₂ apresentaram valores de intensidade variando entre 12,99 e 15,51 e valores de tonalidade entre 0,68 e 0,81 (os valores não são significativamente diferentes entre as amostras). No vinho tinto com filmes de quitosana observa-se um aumento na intensidade da cor de 14 % para 13,94 dos 2 para os 8 meses e a tonalidade mantém-se constante (0,82) com o armazenamento (figura 37). A intensidade da cor do vinho tinto com filme é inferior ao vinho com 40 mg/L de SO₂.

Para as amostras de vinho branco a intensidade diminuiu e a tonalidade aumentou ao longo do tempo para todas as amostras. Ao fim de 8 meses, o vinho branco sem adição de SO₂, com 40 mg/L de SO₂ e com filmes de quitosana apresentam valores de intensidade de 0,40, 0,37 e 0,44, respetivamente e valores de tonalidade de 2,06, 1,96 e 1,98, respetivamente. No vinho branco com filmes de quitosana a intensidade de cor é inferior e a tonalidade é idêntica ao vinho com 40 mg/L de SO₂ (figura 37b).



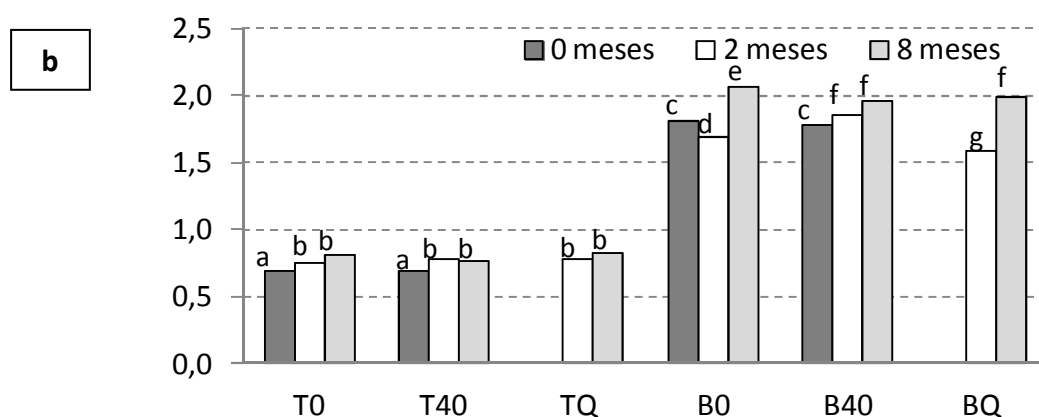


Figura 37 – Valores de (a) intensidade e (b) tonalidade das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de SO_2 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (A), ao longo do armazenamento. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

No segundo método, CIElab, as características cromáticas são expressas pelas coordenadas L^* , a^* e b^* , que indicam respetivamente a luminosidade, os tons de vermelho(+ a^*)/verde(- a^*) e os tons amarelo(+ b^*)/azul(- b^*) representadas na figura 38.

O vinho tinto apresentou valores de luminosidade (L) baixos, que é o mesmo que dizer que o vinho era opaco, sendo o mais opaco o vinho tinto com filmes de quitosana. No vinho tinto verifica-se que o valor de a^* é muito superior ao valor de b^* , o que significa que os vinhos apresentam uma cor vermelha. Os valores de b^* são sempre positivos, a indicar que a componente amarela é superior à componente azul da cor destes vinhos, o que é um resultado normal atendendo a que se trata de um vinho jovem ^[64]. O vinho tinto com quitosana apresenta valores de a^* e b^* ligeiramente inferiores aos vinhos sem adição de SO_2 , mas superiores aos vinhos com 40 mg/L de SO_2 , indicando uma cor menos vermelha para o vinho com adição de filme de quitosana.

No vinho branco os valores de luminosidade (L) são elevados, o que significa que o vinho tinha uma cor mais brilhante. Os valores do parâmetro a^* são negativos e os do parâmetro b^* são positivos que correspondem às cores verdes a amarelas, o que significa que estes vinhos têm uma matriz amarela-esverdeada. Para o vinho branco os valores de b^* são superiores aos valores absolutos de a^* o que implica que a componente amarela da cor destes vinhos é superior à componente verde. No entanto, o vinho branco com



filmes de quitosana é o que apresenta maior componente verde (-a*) em relação ao vinho branco sem adição de SO₂ e ao vinho branco com 40 mg/L de SO₂.

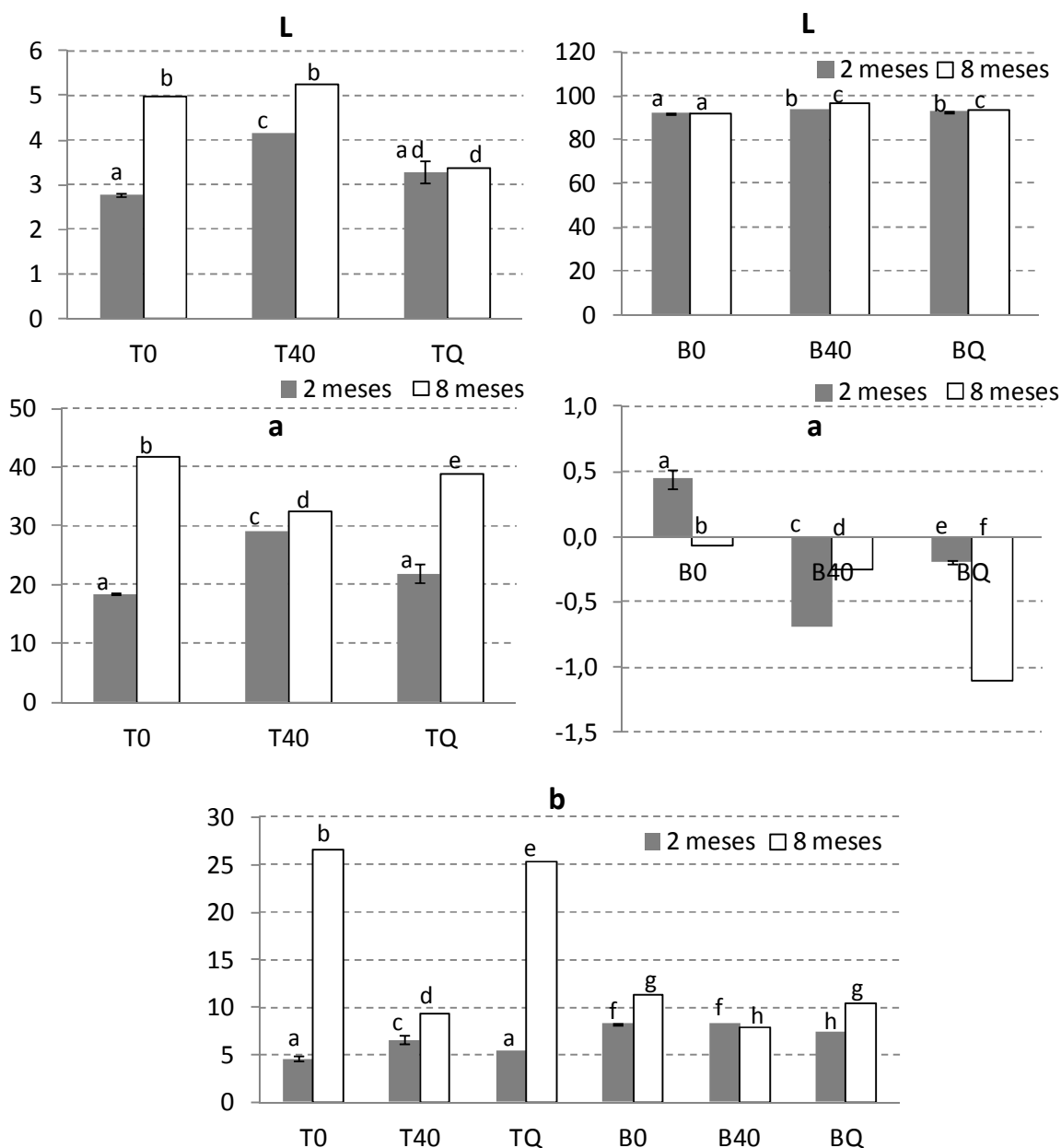


Figura 38 – Valores do L*, a* e b* das amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO₂ (0), com adição de SO₂ 40 mg/L (40) e com o tratamento de filmes de quitosana (Q), ao longo do armazenamento. (letras diferentes representam valores significativamente diferentes, $p < 0,05$ e $n=3$).

4.5.5 – Análise microbiológica

Para verificar a estabilidade microbiológica dos vinhos ao longo do armazenamento foram realizadas análises microbiológicas, ao vinho na altura em que o filme foi adicionado e ao



fim de 2 e 8 meses de armazenamento. Esta análise foi realizada por inoculação em placas com meios específicos para bactérias e leveduras.

As amostras de vinho tinto sem adição de SO_2 , com 40 mg/L de SO_2 e com filmes de quitosana não apresentaram nenhuma unidade formadora de colónias (UFC) para leveduras. Enquanto que, as amostras de vinho tinto sem adição de SO_2 , e com filmes de quitosana têm algum crescimento para bactérias ao fim de 8 meses de armazenamento, sendo inferior no vinho com adição do filme tabela 6.

As amostras de vinho branco apenas apresentaram bactérias ao fim de 2 meses de armazenamento, mas apresentaram leveduras que aumenta com o armazenamento, nomeadamente para o vinho sem adição de SO_2 e com 40 mg/L de SO_2 (tabela 6). As amostras de vinho branco com os filmes de quitosana não apresentaram UFC tanto para bactérias como para leveduras ao fim de 8 meses de armazenamento.

Tabela 6 – Unidades formadoras de colónias (UFC/mL) nas amostras de vinho tinto (T) e branco (B) sem adição de SO_2 (0), com adição de 40 mg/L de SO_2 (40) e com o tratamento dos filmes de quitosana (Q) ao longo do armazenamento.

		B0 mg/L	B40 mg/L	BQ	T0 mg/L	T40 mg/L	TQ
0 meses	Leveduras	$1,2 \times 10^2 \pm 1,6 \times 10^2$	5 ± 7	-	-	-	-
	Bactérias	-	-	-	-	-	-
2 meses	Leveduras	$2,1 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3 \pm 7,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2 \pm 14$	-	-	-
	Bactérias	-	10 ± 14	10 ± 14	5 ± 7	-	5 ± 7
8 meses	Leveduras	$5,8 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$	$8,8 \times 10^3 \pm 9,1 \times 10^2$	-	-	-	-
	Bactérias	-	-	-	$2,5 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$	-	25 ± 35

As amostras de vinho branco com filmes de quitosana estão microbiologicamente estáveis ao fim de 8 meses, não havendo crescimento de leveduras nem de bactérias. Enquanto que as amostras de vinho tinto têm algum crescimento de bactérias.

4.5.6 – Análise sensorial

O resultado da prova organolética efetuada no vinho tinto, relativamente à cor, aroma e gosto, encontra-se na figura 39. A cor dos vinhos é um aspeto importante a nível sensorial e no exame visual o vinho tinto com 40 mg/L de SO_2 apresenta-se mais límpido e menos castanho que o vinho tinto sem adição de SO_2 e o vinho com filmes de quitosana (figura

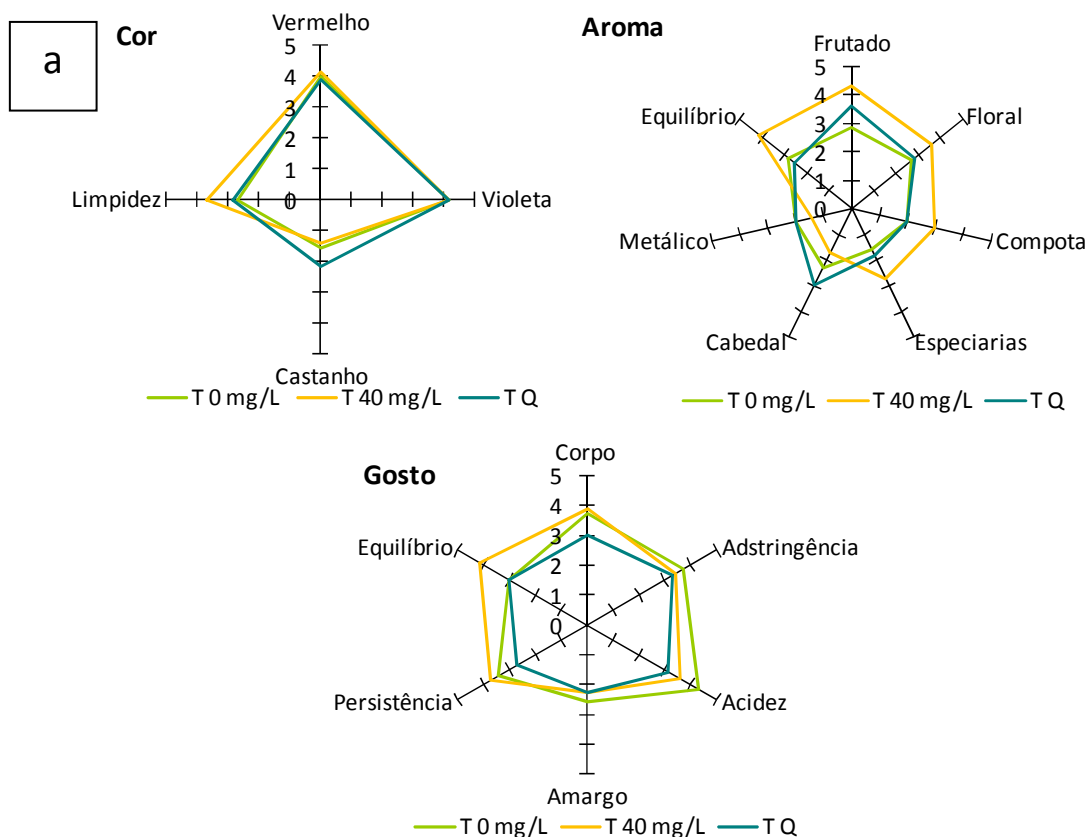


39a), O vinho tinto com 40mg/L de SO_2 apresenta a melhor classificação global da cor (figura 39b).

O aroma global do vinho é resultante da contribuição de centenas de compostos voláteis distintos. No exame olfativo ao vinho tinto com 40 mg/L de SO_2 destacam-se os atributos frutado e floral assim como o equilíbrio, sendo este vinho o que obteve a melhor classificação a nível do aroma. O vinho com filmes de quitosana tem um aroma mais intenso a cabedal o que diminui a sua classificação global (figura 39b).

Ao nível do gosto o vinho tinto com 40mg/L de SO_2 é o mais equilibrado, com um melhor corpo, persistência e equilíbrio e um menor sabor amargo, ácido e adstringente, por este motivo é o vinho com melhor classificação também para o gosto (figura 39b).

Tendo em conta todos os parâmetros, o vinho tinto com 40 mg/L de SO_2 é o que apresenta melhor classificação global (14 numa classificação de 0 a 20), enquanto, o vinho tinto sem adição de SO_2 e o vinho tinto com filmes de quitosana apresentam uma classificação inferior (11 numa classificação de 0 a 20).



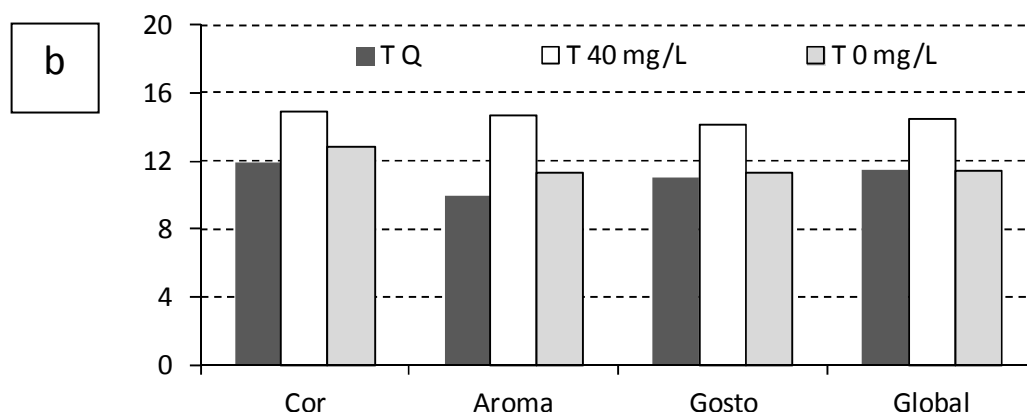


Figura 39 – (a) Principais descritores de cor, aroma e gosto para o vinho tinto e (b) avaliação global da cor, aroma e gosto.

O resultado da prova organolética efetuada no vinho branco, em relação à cor, aroma e gosto, encontra-se na figura 40. No exame visual o vinho branco com filmes de quitosana apresenta-se mais límpido, mais verde e menos castanho que o vinho tinto sem adição de SO_2 e com 40mg/L de SO_2 , apresentando também a melhor classificação global da cor. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para a cor determinada pelos métodos espectrofotométricos (ponto 4.5.4).

No aroma e gosto o vinho branco apresenta o mesmo perfil para todas as amostras, no entanto, o vinho com filmes de quitosana obteve melhor classificação global devido a ser mais equilibrado, floral, frutado e ter melhor corpo, persistência e equilíbrio (figura 40a). Tendo em conta todos os parâmetros, o vinho branco com filmes de quitosana é o que apresenta melhor classificação global (15 numa classificação de 0 a 20).

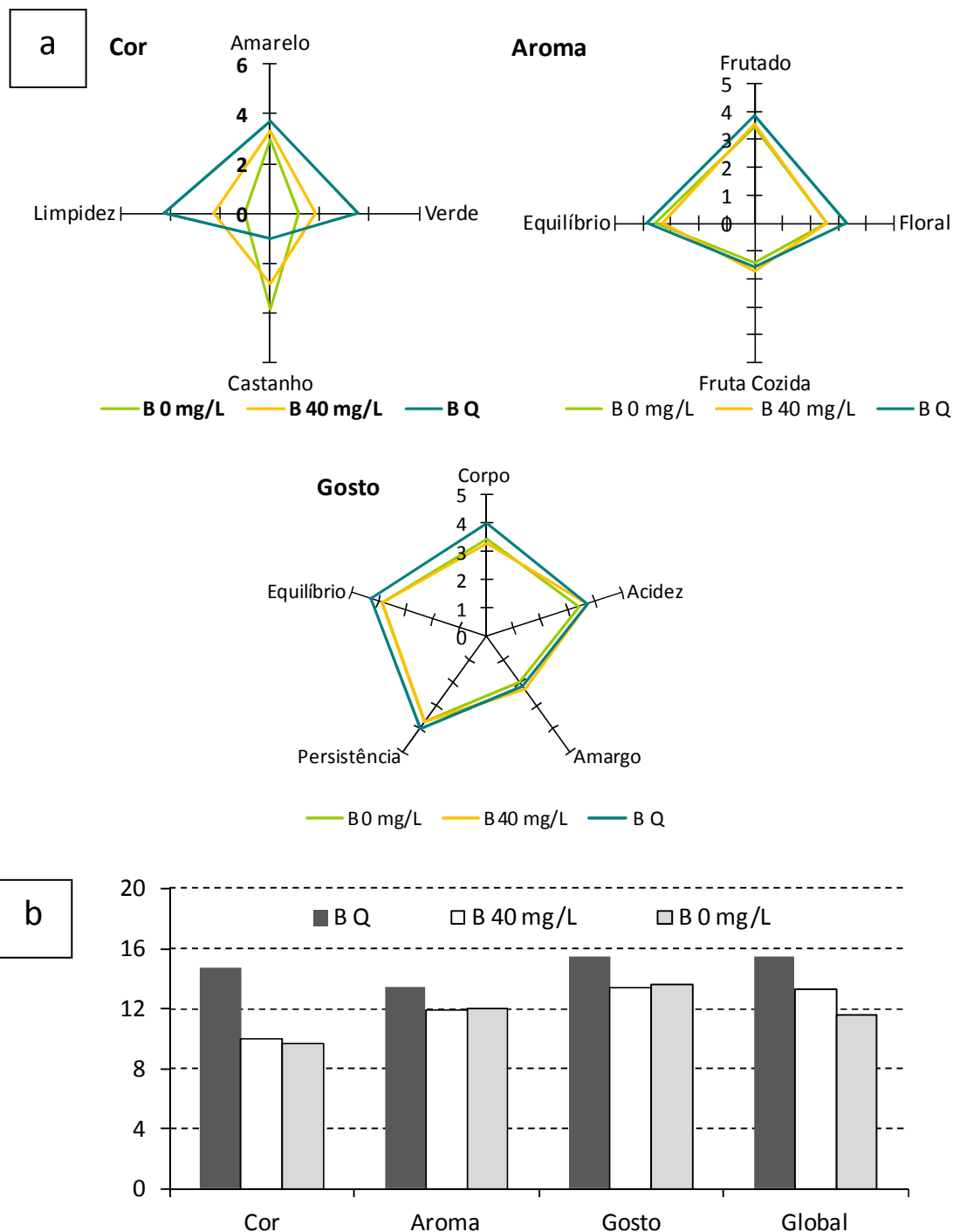


Figura 40 – (a) Principais descritores de cor, aroma e gosto para o vinho branco e (b) avaliação global da cor, aroma e gosto.

O vinho é uma mistura complexa de compostos, definido pela sua aparência, aroma e gosto. Os compostos responsáveis pelas propriedades organoléticas provêm de três fontes principais, as uvas, os microrganismos e a maturação. Durante o processo de vinificação das uvas, o metabolismo microbiano resulta num desejável equilíbrio dos



compostos sensoriais através da modificação das moléculas derivadas da uva e da produção de metabólitos ativos de sabor. A concentração de compostos ativos sensoriais e a sua interação com outros compostos do vinho tem um papel importante na perceção de qualquer tipo de composto ^[97].

Como se verificou o vinho com filmes de quitosana obteve uma classificação inferior ao vinho com 40 mg/L de SO₂ no vinho tinto e obteve uma classificação superior às duas referências no vinho branco (vinho sem adição de SO₂ e com 40 mg/L de SO₂). Concluindo-se que o vinho que melhor beneficia do tratamento com filmes de quitosana é o vinho branco.



5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no trabalho permitem concluir que o tipo de quitosana para a preparação de filmes com menor solubilidade em meio ácido é a quitosana de média viscosidade quando comparada com a de alta e baixa viscosidade. Os filmes de quitosana com genipina mostraram ser menos solúveis em comparação com os produzidos apenas com quitosana. A adição da genipina é fundamental para obter filmes insolúveis em meio ácido para aplicar no vinho. O tempo de reação de 24 h da quitosana com a genipina (0,05 %) foi o melhor para a preparação de filmes com uma menor solubilidade em meio ácido. O filme que apresentou uma menor solubilidade (entre 10-20 % de perda de massa) em meio ácido foi o preparado com quitosana de média viscosidade com adição de genipina (0,05 %) e com tempo de reação de 24 horas.

A incorporação de um extrato de *Aloe vera* ou oligoquitosanas aumentou a atividade antioxidante dos filmes de quitosana com genipina. No entanto, a solubilidade dos filmes com incorporação de *Aloe vera* ou oligoquitosanas aumentaram em 60 % a solubilidade em meio ácido em comparação com os filmes de base de quitosana.

No estudo do efeito do plastificante nos filmes de quitosana com genipina verificou-se que a atividade antioxidante e a insolubilidade dos filmes de quitosana com glicerol foram superiores à dos filmes com sorbitol. O aumento da concentração de glicerol nos filmes aumenta a sua atividade antioxidante (82 %) e diminui a solubilidade (30 %). Assim, os filmes de glicerol 1,5 % apresentam uma percentagem de inibição do ABTS de 93 % ao fim de 46 h e uma percentagem de perda de massa inferior a 15 % ao fim de 7 dias tanto numa matriz modelo de vinho como em água.

Os filmes com maior potencialidade, isto é com maior atividade antioxidante e menor solubilidade, foram caracterizados quanto à sua capacidade antioxidante, solubilidade, propriedades mecânicas e ângulos de contacto. Os filmes de quitosana, sigma média viscosidade com genipina (0,05 %) e glicerol (1,5 %) têm a capacidade de inibir os radicais de ABTS e de DPPH da mesma forma, apresentando a mesma tendência de percentagem de inibição.



Os testes mecânicos dos filmes selecionados mostram que o filme de quitosana com genipina e glicerol 0,75 % diminuiu a tensão de rutura mas apresenta a melhor taxa de deformação em comparação com os filmes de quitosana com genipina. Os filmes de quitosana com genipina e glicerol 1,5 % obtiveram diminuições drásticas na tensão de rutura, na taxa de deformação e no módulo de Young. Pelos ângulos de contacto obtidos para os filmes selecionados pode-se concluir que o aumento da concentração de glicerol provocou uma diminuição da hidrofilicidade da superfície do filme e esta diminuição pode justificar a diminuição da solubilidade destes filmes.

As características dos filmes de quitosana com genipina e glicerol desenvolvidos neste trabalho têm elevada atividade antioxidante e baixa solubilidade, pelo que têm potencial para poderem ser aplicados em vinho como possíveis substitutos da adição de SO_2 .

Os filmes de quitosana foram adicionados a vinho tinto e branco como uma alternativa à adição de dióxido de enxofre para conservar as propriedades do vinho ao longo do armazenamento. A análise das características físico-químicas e carga microbológica dos vinhos com aplicação de filmes de quitosana revelou que todas amostras de vinho estão microbiologicamente estáveis ao fim de 8 meses, não havendo crescimento de leveduras nem de bactérias. O vinho tinto com filmes de quitosana diminuiu a atividade antioxidante, taninos totais e manteve a quantidade de compostos fenólicos totais ao longo do armazenamento que o vinho com 40 mg/L de SO_2 . O tratamento com os filmes de quitosana para o vinho branco aumentou a atividade antioxidante ao longo do armazenamento e o vinho ficou mais verde e mais transparente, em relação ao vinho com 40 mg/L de SO_2 . A nível sensorial verificou-se que o vinho tinto com filmes de quitosana obteve uma classificação igual ao vinho sem adição de SO_2 e inferior ao vinho com 40 mg/L de SO_2 . Enquanto que, o vinho branco obteve uma classificação superior (15 em 20 valores) às duas referências (vinho sem adição de SO_2 e vinho com 40 mg/L de SO_2).

Os vinhos tratados com filmes de quitosana apresentaram resultados promissores, essencialmente para o vinho branco, pois é o que mais beneficia deste tratamento. A tecnologia de filmes de quitosana para conservar as propriedades do vinho poderá ser uma alternativa à adição de SO_2 .



6. PERSPETIVAS FUTURAS

Num trabalho futuro é necessário proceder-se a caracterização de cada uma das quitosanas assim como estudar a reação destas com a genipina e o glicerol para perceber como é que as características da quitosana interferem nas propriedades dos filmes, nomeadamente em termos de solubilidade e atividade antioxidante.

A incorporação ou ligação covalente de compostos com elevada atividade antioxidante, como por exemplo, compostos fenólicos, aos filmes de quitosana com genipina e glicerol desenvolvidos neste trabalho para incrementar as propriedades destes filmes.

Compreender as reações e mecanismos envolvidos entre a quitosana e os compostos de vinho que permitem a conservação do vinho ao longo do armazenamento. Assim como, perceber o motivo pelo qual os filmes de quitosana funcionaram melhor no vinho branco em relação ao vinho tinto.

Os filmes de quitosana com incorporação de *Aloe vera* e oligoquitosanas aumentaram a atividade antioxidante do filme base, por isso será interessante o estudo dessa propriedade para outras aplicações.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernandes, S.C.M., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., and Gandini, A., *Novel materials based on chitosan and cellulose*. Polymer International, 2011. 60(6): p. 875-882.
2. Kumar, M.N.V.R., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 2000. 46(1): p. 1-27.
3. Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A., and Giosafatto, C.V.L., *Transglutaminase Crosslinked Pectin- and Chitosan-based Edible Films: A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011. 51(3): p. 223-238.
4. Xia, W.S., Liu, P., Zhang, J.L., and Chen, J., *Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides*. Food Hydrocolloids, 2011. 25(2): p. 170-179.
5. Krajewska, B., *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. 35(2-3): p. 126-139.
6. Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.-J., *Food applications of chitin and chitosans*. Trends in Food Science & Technology, 1999. 10(2): p. 37-51.
7. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., and Choudhari, Y.M., *Chitooligosaccharides: Synthesis, Characterization and Applications*. Polymer Science Series A, 2011. 53(7): p. 583-612.
8. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., and Heras, A., *Functional Characterization of Chitin and Chitosan*. Current Chemical Biology, 2009. 3(2): p. 203-230.
9. Kim, S.-K. and Rajapakse, N., *Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review*. Carbohydrate Polymers, 2005. 62(4): p. 357-368.
10. Park, P.J., Je, J.Y., Jung, W.K., Ahn, C.B., and Kim, S.K., *Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates*. European Food Research and Technology, 2004. 219(5): p. 529-533.
11. Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., and Minami, S., *Analgesic effects of chitin and chitosan*. Carbohydrate Polymers, 2002. 49(3): p. 249-252.
12. Muzzarelli, R.A.A., Orlandini, F., Pacetti, D., Boselli, E., Frega, N.G., Tosi, G., and Muzzarelli, C., *Chitosan taurocholate capacity to bind lipids and to undergo enzymatic hydrolysis: An in vitro model*. Carbohydrate Polymers, 2006. 66(3): p. 363-371.
13. Ogawa, S., Decker, E.A., and McClements, D.J., *Influence of Environmental Conditions on the Stability of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(18): p. 5522-5527.
14. Felse, P.A. and Panda, T., *Studies on applications of chitin and its derivatives*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1999. 20(6): p. 505-512.
15. Campos, C.A., Gerschenson, L.N., and Flores, S.K., *Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity*. Food and Bioprocess Technology, 2011. 4(6): p. 849-875.
16. Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z., and Yao, K.D., *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan*. Journal of Applied Polymer Science, 2001. 79(7): p. 1324-1335.
17. Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S., *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2001. 71(2-3): p. 235-244.
18. Roller, S. and Covill, N., *The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 47(1-2): p. 67-77.
19. Vinsova, J. and Vavrikova, E., *Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosan*. Current Pharmaceutical Design, 2008. 14(13): p. 1311-1326.
20. Chen, A.-S., Taguchi, T., Sakai, K., Kikuchi, K., Wang, M.-W., and Miwa, I., *Antioxidant Activities of Chitobiose and Chitotriose*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003. 26(9): p. 1326-1330.
21. Karadag, A., Ozelik, B., and Saner, S., *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities*. Food Analytical Methods, 2009. 2(1): p. 41-60.
22. Chen, G., Mi, J., Wu, X., Luo, C., Li, J., Tang, Y., and Li, J., *Structural features and bioactivities of the chitosan*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. 49(4): p. 543-7.
23. Sousa, F., Guebitz, G.M., and Kokol, V., *Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids*. Process Biochemistry, 2009. 44(7): p. 749-756.



24. Chien, P.-J., Sheu, F., Huang, W.-T., and Su, M.-S., *Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice*. Food Chemistry, 2007. 102(4): p. 1192-1198.
25. Tomida, H., Yasufuku, T., Fujii, T., Kondo, Y., Kai, T., and Anraku, M., *Polysaccharides as potential antioxidative compounds for extended-release matrix tablets*. Carbohydrate Research, 2010. 345(1): p. 82-86.
26. Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., and Gurny, R., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. 57(1): p. 19-34.
27. Tharanathan, R.N. and Kittur, F.S., *Chitin - The undisputed biomolecule of great potential*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2003. 43(1): p. 61-87.
28. Muzzarelli, R.A.A., *Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids*. Carbohydrate Polymers, 2009. 77(1): p. 1-9.
29. Chen, M.-C., Liu, C.-T., Tsai, H.-W., Lai, W.-Y., Chang, Y., and Sung, H.-W., *Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent*. Biomaterials, 2009. 30(29): p. 5560-5571.
30. Sung, H.-W., Chang, Y., Chiu, C.-T., Chen, C.-N., and Liang, H.-C., *Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. 47(2): p. 116-126.
31. Tsai, C.-C., Chang, Y., Sung, H.-W., Hsu, J.-C., and Chen, C.-N., *Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an in vitro study*. Biomaterials, 2001. 22(6): p. 523-533.
32. Butler, M.F., Ng, Y.F., and Pudney, P.D.A., *Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin*. Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2003. 41(24): p. 3941-3953.
33. Mi, F.-L., Sung, H.-W., and Shyu, S.-S., *Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2000. 38(15): p. 2804-2814.
34. Jelly, R., Patton, E.L.T., Lennard, C., Lewis, S.W., and Lim, K.F., *The detection of latent fingerprints on porous surfaces using amino acid sensitive reagents: A review*. Analytica Chimica Acta, 2009. 652(1-2): p. 128-142.
35. Lee, J.H., Lee, D.U., and Jeong, C.S., *Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats*. Food and Chemical Toxicology, 2009. 47(6): p. 1127-1131.
36. Wang, S.C., Tseng, T.Y., Huang, C.M., and Tsai, T.H., *Gardenia herbal active constituents: applicable separation procedures*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004. 812(1-2): p. 193-202.
37. Liu, B.-S., Yao, C.-H., and Fang, S.-S., *Evaluation of a Non-Woven Fabric Coated with a Chitosan Bi-Layer Composite for Wound Dressing*. Macromolecular Bioscience, 2008. 8(5): p. 432-440.
38. Chen, H., Ouyang, W., Lawuyi, B., Martoni, C., and Prakash, S., *Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. 75A(4): p. 917-927.
39. Mi, F.-L., Shyu, S.-S., and Peng, C.-K., *Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2005. 43(10): p. 1985-2000.
40. Dutta, P.K., Dutta, J., and Tripathi, V.S., *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of Scientific & Industrial Research, 2004. 63(1): p. 20-31.
41. Dutta, P.K., Ravikumar, M.N.V., and Dutta, J., *CHITIN AND CHITOSAN FOR VERSATILE APPLICATIONS*. Journal of Macromolecular Science: Polymer Reviews, 2002. 42(3): p. 307.
42. Eugene, K., *Chitin: a biomaterial in waiting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2002. 6(4): p. 313-317.
43. Kurita, K., *Controlled functionalization of the polysaccharide chitin*. Progress in Polymer Science, 2001. 26(9): p. 1921-1971.
44. Lin, D. and Zhao, Y.Y., *Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007. 6(3): p. 60-75.



45. Miller, K.S. and Krochta, J.M., *Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review*. Trends in Food Science & Technology, 1997. 8(7): p. 228-237.
46. Arvanitoyannis, I., Kolokuris, I., Nakayama, A., Yamamoto, N., and Aiba, S.-i., *Physico-chemical studies of chitosan-poly(vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose*. Carbohydrate Polymers, 1997. 34(1-2): p. 9-19.
47. Wani, M.Y., Hasan, N., and Malik, M.A., *Chitosan and Aloe Vera: Two Gifts of Nature*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2010. 31(6): p. 799-811.
48. Geremias, R., Pedrosa, R.C., Locatelli, C., de Fávère, V.T., Coury-Pedrosa, R., and Laranjeira, M.C.M., *Lipid lowering activity of hydrosoluble chitosan and association with Aloe vera L. and Brassica olearaceae L.* Phytotherapy Research, 2006. 20(4): p. 288-293.
49. Silva, É.R.D., *Avaliação do potencial de revestimentos de quitosano e Aloe vera em morangos*. 2010, Universidade de Aveiro: Aveiro.
50. Santosa, F.X.B. and Padua, G.W., *Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(5): p. 2070-2074.
51. Suyatma, N.E., Tighzert, L., and Copinet, A., *Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(10): p. 3950-3957.
52. Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., and Oromiehie, A., *Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefirin*. Carbohydrate Polymers, 2011. 84(1): p. 477-483.
53. Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., and Tharanathan, R.N., *Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films*. Food Hydrocolloids, 2007. 21(7): p. 1113-1122.
54. Beer, F.P. and Johnston, E.R., *Resistência dos Materiais*. 3rd ed. 1989, São Paulo: Makron Books.
55. Yoshida, C.M.P., Oliveira Junior, E.N., and Franco, T.T., *Chitosan tailor-made films: the effects of additives on barrier and mechanical properties*. Packaging Technology and Science, 2009. 22(3): p. 161-170.
56. Pérez-Jiménez, J. and Saura-Calixto, F., *Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays*. Food Research International, 2006. 39(7): p. 791-800.
57. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
58. Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(6): p. 1841-1856.
59. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. Analytical Biochemistry, 1996. 239(1): p. 70-76.
60. Dawidowicz, A.L., Wianowska, D., and Olszowy, M., *On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity)*. Food Chemistry, 2012. 131: p. 1037-1043.
61. Machado, R.M.D., Figueiredo Toledo, M.C., and Vicente, E., *Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure*. European Food Research and Technology, 2009. 229(3): p. 383-389.
62. Bakalinsky, A.T., *Sulfites, wine, and health*. Wine in Context: Nutrition - Physiology - Policy, ed. A.L. Waterhouse and J.M. Rantz. 1996, Davis: American Society Enology & Viticulture. 35-42.
63. Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Martín-Belloso, O., and Ancín-Azpilicueta, C., *Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields*. Food Chemistry, 2007. 103(3): p. 771-777.
64. Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., Garcia-Viguera, C., Reader, H.P., and Watkins, S.J., *Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. 78(3): p. 297-307.
65. Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A., *Role of Carbonyl Compounds in SO₂ Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. 48(8): p. 3413-3419.



66. Torun, M., Bayhan, A., and Yentur, G., *RESPONSE OF ALLERGIC AND NORMAL PERSONS TO SULFATING AGENTS IN WINE - DETERMINATION OF THIOSULFATE EXCRETION IN URINE*. Clinical Chemistry, 1989. 35(8): p. 1792-1793.
67. Gao, Y.C., Zhang, G.P., Krentz, S., Darius, S., Power, J., and Lagarde, G., *Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2002. 8(1): p. 76-83.
68. Li, H., Guo, A., and Wang, H., *Mechanisms of oxidative browning of wine*. Food Chemistry, 2008. 108(1): p. 1-13.
69. *REGULAMENTO (CE) N.º 606/2009 DA COMISSÃO de 10 de Julho de 2009*. 2009, Jornal Oficial da União Europeia.
70. Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V., *Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms*. Food Microbiology, 2008. 25(2): p. 422-427.
71. Cejudo-Bastante, M.J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M.S., and Riponi, C., *Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines*. LWT - Food Science and Technology, 2010. 43(10): p. 1501-1507.
72. Sonni, F., Chinnici, F., Natali, N., and Riponi, C., *Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines*. Food Chemistry, 2011. 129(3): p. 1193-1200.
73. García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A.J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P.J., and Moreno-Arribas, M.V., *Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine*. Food Control, 2008. 19(9): p. 835-841.
74. Mok, C., Song, K.-T., Park, Y.-S., Lim, S., Ruan, R., and Chen, P., *High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine*. Journal of Food Science, 2006. 71(8): p. M265-M269.
75. Ramirez, R., Saraiva, J., Pérez Lamela, C., and Torres, J., *Reaction Kinetics Analysis of Chemical Changes in Pressure-Assisted Thermal Processing*. Food Engineering Reviews, 2009. 1(1): p. 16-30.
76. Santos, M., Nunes, C., Saraiva, J., and Coimbra, M., *Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations*. European Food Research and Technology, 2012: p. 1-12.
77. Holan, Z., Votruba, J., and Vlasáková, V., *New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid*. Journal of Chromatography A, 1980. 190(1): p. 67-76.
78. Niola, F., Basora, N., Chornet, E., and Vidal, P.F., *A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC*. Carbohydrate Research, 1993. 238(0): p. 1-9.
79. Kasai, M.R., *Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review*. J Agric Food Chem, 2009. 57(5): p. 1667-76.
80. Nunes, C., Rocha, S.M., Saraiva, J., and Coimbra, M.A., *Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID)*. Carbohydrate Polymers, 2006. 64(2): p. 306-311.
81. Santos, C., Seabra, P., Veleirinho, B., Delgadillo, I., and Lopes da Silva, J.A., *Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes*. European Polymer Journal, 2006. 42(12): p. 3277-3285.
82. Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E., *Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure*. Chim. Anal., 1966. 2: p. 627-631.
83. Darné, G., *Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne*. 1991, University of Bordeaux I: France.
84. *Determinações analíticas*, in *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 1990, Regulamento (CE) da Comissão.
85. Skouroumounis, G.K., Kwiatkowski, M.J., Francis, I.L., Oakey, H., Capone, D.L., Duncan, B., Sefton, M.A., and Waters, E.J., *The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005. 11(3): p. 369-377.



86. Jin, J., Song, M., and Hourston, D.J., *Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties*. *Biomacromolecules*, 2004. 5(1): p. 162-168.
87. Mi, F.L., Huang, C.T., Liang, H.F., Chen, M.C., Chiu, Y.L., Chen, C.H., and Sung, H.W., *Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(9): p. 3290-3296.
88. Rodríguez, E.R., Martín, J.D., and Romero, C.D., *Aloe vera as a Functional Ingredient in Foods*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010. 50(4): p. 305-326.
89. Hu, Y., Xu, J., and Hu, Q., *Evaluation of Antioxidant Potential of Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) Extracts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(26): p. 7788-7791.
90. Wei, A. and Shibamoto, T., *Antioxidant/Lipoxygenase Inhibitory Activities and Chemical Compositions of Selected Essential Oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. 58(12): p. 7218-7225.
91. Hosseini, M.H., Razavi, S.H., and Mousavi, M.A., *ANTIMICROBIAL, PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF CHITOSAN-BASED FILMS INCORPORATED WITH THYME, CLOVE AND CINNAMON ESSENTIAL OILS*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2009. 33(6): p. 727-743.
92. Eshun, K. and He, Q., *Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries - A review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004. 44(2): p. 91-96.
93. Casariego, A., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Cruz, L., and Diaz, R., *Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot*. *Food Hydrocolloids*, 2008. 22(8): p. 1452-1459.
94. Larena, A. and Cáceres, D.A., *Variability between chitosan membrane surface characteristics as function of its composition and environmental conditions*. *Applied Surface Science*, 2004. 238(1-4): p. 273-277.
95. Kerch, G. and Korkhov, V., *Effect of storage time and temperature on structure, mechanical and barrier properties of chitosan-based films*. *European Food Research and Technology*, 2011. 232(1): p. 17-22.
96. Sánchez-Moreno, C., Cao, G., Ou, B., and Prior, R.L., *Anthocyanin and Proanthocyanidin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity Comparison with Nontraditional Wines Obtained from Highbush Blueberry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(17): p. 4889-4896.
97. Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A., *Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review*. *International Journal of Food Microbiology*, 2008. 125(1): p. 60-70.